



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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



**ПРОБЛЕМА
МАССОВОЙ ГИБЕЛИ САЙГАКОВ**
стр. 40

**MASS DEATHS OF SAIGA
ANTELOPES**
p. 40



**ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ
ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ
НА ТЕРРИТОРИИ УБСУНУРСКОГО
МИГРАЦИОННОГО ОЧАГА
РЕСПУБЛИКИ ТЫВА**
стр. 8

**STUDY OF AVIAN INFLUENZA
VIRUS CIRCULATION
IN UVS-NUUR BIRD MIGRATION
AREA IN REPUBLIC OF TYVA**
p. 14



**ВАКЦИННЫЕ МАСЛЯНЫЕ
АДЪЮВАНТЫ ДЛЯ РАЗВИТИЯ
АКВАКУЛЬТУРЫ**
стр. 62

**VACCINE OIL ADJUVANTS
FOR THE DEVELOPMENT
OF AQUACULTURE**
p. 62

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 №4 (19) 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: lozovoy@arriah.ru

Шеф-редактор: Юлия Мелано
Выпускающие редакторы: Ольга Лаврухина, Ольга Лесных, Кристина Михеева
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»:



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;



Лаврухина О.И. – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ» – выпускающий редактор;



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



Метлин А.Е. – кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



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



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



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, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ»;



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



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



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



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



Субботин А.М. – директор Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, главный государственный ветеринарный врач Республики Беларусь, главный государственный ветеринарный инспектор Республики Беларусь, г. Минск;



Шахов А.Г. – член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, ГНУ ВНИИВФТИ 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.

Зарегистрированный товарный знак, свидетельство №514190

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 15 ноября 2016 года

Дата выхода 01.12.2016

СОДЕРЖАНИЕ

НОВОСТИ

5 Иголкин А.С.
50 ЛЕТ В СТРОЮ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

7 О проведении 6-го заседания проекта по трансграничной торговле и снижению риска трансграничных болезней животных между Китаем, Монголией и Россией

БОЛЕЗНИ ПТИЦ

8 М.С. Волков, А.В. Варкентин, В.Н. Ирза, И.А. Чвала, А.Э. Меньщикова, А.В. Андриясов, М.А. Циванюк, Ч.Б.-О. Оюн, С.В. Роголев, М.Ш.-О. Арапчор
Изучение циркуляции вируса гриппа птиц на территории убсунурского миграционного очага Республики Тыва

19 С.П. Лазарева, М.А. Волкова, Н.С. Мудрак, И.А. Чвала, Т.В. Жбанова
Разработка иммуноферментной тест-системы для определения антител к вирусу лейкоза птиц

29 М.А. Волкова, П.С. Ярославцева, В.Ю. Сосипаторова, Т.И. Ерошина, И.А. Чвала
Изучение патогенеза и иммунного ответа при экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятом метапневмовируса птиц подтипа В

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

35 М.Н. Гусева, Д.В. Михалишин, А.А. Шишкова, Д.С. Большаков, Б.Л. Манин, М.А. Шевченко
Оптимизация состава питательных сред для культивирования суспензии клеток ВНК-21/2-17

40 А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, А.К. Караулов, А.В. Потехин, А.П. Межнев
Проблема массовой гибели сайгаков

46 М.С. Кукушкина, О.А. Рябикина, А.В. Кононов, В.И. Диев
Изучение чувствительности крупного рогатого скота и овец к вирусу нодулярного дерматита при экспериментальном заражении

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

49 Е.П. Баборенко
Изучение поствакцинального иммунитета при использовании вакцин против вируса болезни Ауески свиней из маркированного штамма

53 А.С. Оганесян, М.А. Шибаяев, Н.Е. Баскакова
Репродуктивно-респираторный синдром свиней в Российской Федерации: системы контроля, идентификация риска

ДРУГИЕ БОЛЕЗНИ

62 J.B. Arous, L. Dupuis
Вакцинные масляные адъюванты для развития аквакультуры

66 П.А. Руденко
Анализ видового состава и популяционного уровня микрофлоры в контроле эффективности лечения сепсиса у кошек

CONTENTS

NEWS

5 A.S. Igolkin
50 years in the service of “ARRIAH”

AVIAN DISEASES

14 M.S. Volkov, A.V. Varkentin, V.N. Irza, I.A. Chvala, A.E. Menshikova, A.V. Andriyasov, M.A. Tsivanyuk, Ch.B.-O. Oyun, S.V. Rogolev, M.Sh.-O. Arapchor
Study of avian influenza virus circulation in uvs-nuur migration area in Republic of Tyva

24 S.P. Lazareva, M.A. Volkova, N.S. Mudrak, I.A. Chvala, T.V. Zhdanova
Development of the immunoenzyme test system for detection of antibodies against avian leukosis virus

29 M.A. Volkova, P.S. Yaroslavtseva, V.Yu. Sosipatorova, T.I. Eroshina, I.A. Chvala
Study of pathogenesis and immune response at experimental infection of broiler chicks with avian metapneumovirus subtype B

BOVINE DISEASES

35 M.N. Guseva, D.V. Mikhailishin, A.A. Shishkova, D.S. Bolshakov, B.L. Manin, M.A. Shevchenko
Optimization of nutrient medium composition for BHK-21/2-17 suspension culture

40 A.V. Mischenko, V.A. Mischenko, A.K. Karaulov, A.V. Potekhin, A.P. Mezhnev
Mass deaths of saiga antelopes

46 M.S. Kukushkina, O.A. Ryabikina, A.V. Kononov, V.I. Diev
Study of experimentally infected cattle and sheep sensitivity to lumpy skin disease

PORCINE DISEASE

49 E.P. Baborenko
Study of postvaccinal immunity after use of marked strain-based vaccine against Aujeszky's disease in pigs

53 A.S. Oganesyanyan, M.A. Shibayev, N.E. Baskakova
Porcine reproductive and respiratory syndrome in the Russian Federation: control systems, risk identification

OTHER DISEASES

62 J.B. Arous, L. Dupuis
Vaccine oil adjuvants for the development of aquaculture

66 P.A. Rudenko
Microflora species and population analysis for feline sepsis treatment efficiency control

НОВОСТИ

УДК 061:619(091)

50 ЛЕТ В СТРОЮ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.С. Иголкин

заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлена характеристика научно-производственной и общественной деятельности трех ветеранов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: Рахманова А.М., Захарова В.М., Перевозчиковой Н.А., докторов наук, профессоров, проработавших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» более 50 лет.

Ключевые слова: ветераны труда, проработавшие в ФГБУ «ВНИИЗЖ» более 50 лет.

Пятого сентября 2016 г. исполнилось 50 лет плодотворной работы в стенах нашего института заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора ветеринарных наук, заслуженного профессора ФГБУ «ВНИИЗЖ» **Рахманова Анатолия Михайловича**. После окончания в 1952 г. Воронежского зооветеринарного института он обучался в аспирантуре Ленинградского ветеринарного института, после чего по направлению МСХ СССР десять лет работал в Республике Казахстан в Семипалатинском зооветеринарном институте ассистентом, доцентом, зам. декана ветеринарного факультета, проректором института по научной работе. Там же выполнил докторскую диссертацию, посвященную патологии отравлений животных и их дифференциальной диагностике от инфекционных болезней, которую успешно защитил в Ленинградском ветеринарном институте в 1967 г.

Придя во Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт (ВНИИЯИ) в самом начале его формирования на должность заведующего вновь образованной лаборатории патоморфологии и цитопатологии уже высококвалифицированным научным сотрудником, будучи одно время единственным в институте доктором наук, Анатолий Михайлович уделял много внимания организации комплексных научных исследований в лаборатории и институте, подготовке аспирантов, повышению квалификации сотрудников. За 50-летний период работы в должностях заведующего лабораторией (29 лет), главного научного сотрудника, научного консультанта и эксперта им опубликовано более 400 научных работ в различных журналах, материалах конференций, симпозиумов и конгрессов, проводимых в нашей стране и за рубежом. Он является соавтором

монографии «Ящур» (М., 1990), трех руководств по патологии животных и двух учебников по патологической анатомии животных для с.-х. вузов, имеет 4 авторских свидетельства на изобретения. В 1978 г. ему присвоено звание профессора.

Исследования А.М. Рахманова и его учеников посвящены актуальным проблемам инфекционной патологии животных, разработке и обоснованию прогнозов возникновения и распространения особо опасных болезней животных, разработке методов диагностики, мер профилактики и борьбы с ними в СССР, России и странах СНГ. А.М. Рахманов является одним из основных разработчиков «Программы совместных действий государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром в государствах Содружества на период до 2010 г.» и «Комплекса совместных мер государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром на период до 2020 г.», утвержденных Советом глав правительств СНГ в 2004 и 2014 гг.

По материалам научных исследований А.М. Рахманова разработано и утверждено более 70 нормативно-технических документов. При научной консультации и под его руководством защищены одна докторская и десять кандидатских диссертаций. Он систематически читал и читает лекции на курсах повышения квалификации, на различных семинарах в Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Российской инженерной академии менеджмента и агробизнеса, ВВЦ, Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории, ФГБУ «Центр ветеринарии» МСХ РФ, Донском ГАУ и др. По заданиям министерств сельского хозяйства СССР и РФ часто выезжал в командировки в разные регионы страны для оказания помощи на местах по диагностике, профилактике и борьбе с инфекционными болезнями животных, участия в различных совещаниях и семинарах, на которых выступал с лекциями и докладами.

Анатолий Михайлович является и активным общественным деятелем: неоднократно избирался членом и секретарем партбюро института, членом Владимирского горкома КПСС, депутатом Владимирского горсовета народных депутатов, зам. председателя правления Владимирской областной организации общества «Знание». Являлся членом диссертационных советов при ВНИИЯИ и ВНИИВиМ, членом экспертного совета ВАК РФ (15 лет), членом секции «Инфекционная патология животных» РАСХН, делегатом XXI Всемирного ветери-

нарного конгресса, членом подготовительной комиссии этого конгресса, членом оргкомитетов Всесоюзных и Всероссийских научных конференций ветеринарных патологоанатомов (1960–2014 гг.). В настоящее время — член ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», член Президиума Всероссийской ассоциации ветеринарных патологоанатомов (с 1969 г.).

В 2003 г. А.М. Рахманов вместе с В.Л. Узюмовым написали и издали «Историю ВНИИИ (1958–1992 гг.) и ВНИИЗЖ (1992–2003 гг.)», в 2008 г. подготовили к изданию сборник «История федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), 1958–2008», в которых приведены основные этапы создания, становления и деятельности этого института.

В 1995 г. А.М. Рахманову присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации», в 2011 г. — «Заслуженный профессор ФГБУ «ВНИИЗЖ». Награжден медалями «За доблестный труд», «За трудовую доблесть», «Ветеран труда», нагрудными знаками «Отличник сельского хозяйства СССР» и «Участнику ликвидации последствий ЧС» МЧС РФ, медалями ВДНХ, Почетными грамотами.

Не так давно в ФГБУ «ВНИИЗЖ» еще двое ветеранов отметили 50-летие своей деятельности в нашем учреждении. **Захаров Валерий Михайлович** в 1963 г. после окончания Московской ветеринарной академии был направлен на работу во ВНИИИ, где был старшим лаборантом, аспирантом, младшим и старшим научным сотрудником лабораторий иммунологии и эпизоотологии, затем зав. отделом экономических исследований и координации НИР, заместителем директора ВНИИЗЖ по научной работе, главным научным сотрудником информационно-аналитического центра, ученым секретарем института, экспертом.

В период с 1977 по 1980 г. В.М. Захаров был направлен в Народную Республику Конго, где руководил отделом вирусологии и эпизоотологии Научно-ветеринарной лаборатории МСХ СССР.

В 1970 г. защитил кандидатскую, в 1999 г. — докторскую диссертацию, посвященную анализу мер борьбы с ящурой и их совершенствованию в СССР и странах СНГ. Им опубликовано более 300 научных работ по различным аспектам инфекционной патологии при ящуре, африканской и классической чуме свиней, болезни Ауески, репродуктивно-респираторном синдроме свиней, бешенстве животных, оспе овец и др. Оригинальные разработки защищены 17 авторскими свидетельствами на изобретения и патентами. По материалам научных разработок утверждено более 60 нормативно-технических документов. Им проведены обширные исследования по изучению экологии возбудителей вирусной и бактериальной этиологии, разработке вакцинных и диагностических препаратов, мер борьбы и профилактики инфекционных болезней животных. Научные разработки В.М. Захарова успешно применяются в ветеринарной практике. Под руководством В.М. Захарова осуществлен комплекс исследовательских и организационных работ по гармонизации противоэпизоотических мероприятий на уровне стран СНГ. Дано обоснование создания буферной зоны стран СНГ в Закавказье, обеспечено ее функционирование под эгидой и с финансовой поддержкой МЭБ и ФАО. С 1999 г. В.М. Захаров является экспертом МЭБ по ящуре для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья, академиком РАЕН, членом ученого и диссер-

тационного совета при ФГБУ «ВНИИЗЖ». Принимает активное участие в подготовке научных кадров, под его научным руководством защищено 12 кандидатских диссертаций. В 1995 г. В.М. Захарову присвоено почетное звание «Заслуженный ветеран Российской Федерации», в 2006 г. — звание профессора. Награжден медалями «За доблестный труд», «Ветеран труда», 5 медалями ВДНХ.

Перевозчикова Наталья Александровна после окончания Горьковского государственного университета в 1965 г. была направлена во ВНИИИ, где в лаборатории биофизики трудилась старшим лаборантом, аспирантом, младшим и старшим научным сотрудником. Затем 15 лет работала зав. лабораторией молекулярной биологии и 12 лет — руководителем отдела координации НИР.

За время работы заведующей лабораторией в сотрудничестве со специалистами Всесоюзного научно-исследовательского института молекулярной биологии Минмедбиопрома СССР (пос. Кольцово Новосибирской области) и Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина АМ СССР (г. Москва) Н.А. Перевозчикова внесла существенный вклад в организацию работ и подготовку квалифицированных кадров для обеспечения условий проведения исследований методами молекулярной биологии на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Высокая работоспособность, эрудиция и организованность в работе позволили Н.А. Перевозчиковой подготовить и в 1995 г. защитить докторскую диссертацию. Под ее руководством с использованием методов молекулярной биологии детально изучены производственные и полевые штаммы вируса ящура разных типов. Впервые определена полная первичная структура генома вируса ящура ряда отечественных производственных штаммов и эпизоотических изолятов. Были оптимизированы условия наработки, выделения и очистки рекомбинантных белков, изучены их основные свойства и показана на лабораторных и естественно восприимчивых животных выработка вирусоспецифических антител при их введении. В процессе выполнения научных исследований при непосредственном участии Натальи Александровны разработан комплекс методик по молекулярному клонированию, оценке и использованию клонированных фрагментов и продуктов их экспрессии, две из которых защищены патентами. В отечественных и зарубежных изданиях опубликовано свыше 200 научных работ. Она подготовила 6 кандидатов наук, в 1997 г. ей присвоено звание профессора.

Н.А. Перевозчикова трижды избиралась депутатом Владимирского горсовета народных депутатов, была членом экспертного совета ВАК РФ. Является членом ученого и диссертационного советов при ФГБУ «ВНИИЗЖ». Награждена медалью «За трудовое отличие», Почетными грамотами Министерства сельского хозяйства и Министерства науки, промышленности и технологии РФ.

Поколения научных сотрудников и аспирантов ФГБУ «ВНИИЗЖ» многие годы общаются с нашими ветеранами, учатся у них, сотрудничают с ними, пользуются их консультациями и советами. Мы благодарны им за их многолетний труд, помощь в обучении и ежедневной работе, за внесенный вклад в достижения ФГБУ «ВНИИЗЖ». Желаем им доброго здоровья, бодрости, дальнейших успехов в жизни и делах!

О ПРОВЕДЕНИИ 6-ГО ЗАСЕДАНИЯ ПО ТРАНСГРАНИЧНОЙ ТОРГОВЛЕ И СНИЖЕНИЮ РИСКА ТРАНСГРАНИЧНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ МЕЖДУ КИТАЕМ, МОНГОЛИЕЙ И РОССИЕЙ

С 11 по 13 октября 2016 года на базе подведомственного Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» состоялось 6-е заседание по трансграничной торговле и снижению риска трансграничных болезней животных между Китаем, Монголией и Россией под эгидой ФАО.

На заседании присутствовали высокопоставленные представители ветеринарных ведомств КНР, Монголии и России, а также высокопрофессиональные команды из каждой страны, включающие лабораторных экспертов, эпизоотологов, технических экспертов и представителей аймаков/провинций.

На заседании присутствовали д-р Wang Gongmin, заместитель руководителя Ветеринарного бюро Министерства сельского хозяйства Китая; д-р Binderiya Batsukh, генеральный директор отдела международного сотрудничества Департамента государственной администрации и управления; заместитель руководителя Россельхознадзора д-р Евгений Непоклонов, главный ветеринарный инспектор Российской Федерации. На заседании также присутствовали представители международных организаций, включая д-ра Guo Fusheng, руководителя группы Центра по чрезвычайным ситуациям, связанным с трансграничными болезнями жи-

вотных (ECTAD), представители Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) в Китае и Монголии. Представители ФГБУ «ВНИИЗЖ» также присутствовали на заседании.

Данное заседание было сфокусировано на усилении сотрудничества и обмена информацией между тремя странами-участниками: КНР, Монголией и Россией. В ходе заседания внимание акцентировали на пяти TADs: африканская чума свиней (АЧС), ящур, высокопатогенный грипп птиц (ВПГП), чума мелких жвачных (ЧМЖ) и нодулярный дерматит крупного рогатого скота.

На заседании каждой из этих значимых болезней была посвящена одна сессия, на которой представители трех стран-участниц делились информацией о ситуации в их стране, включая информацию о наличии или отсутствии болезни в регионе, эпизоотологии, сообщениях о вспышках, программах контроля или профилактических мерах, а также о деятельности по надзору.

Данное заседание позволило найти возможности для многостороннего сотрудничества и безопасной международной торговли животными и продуктами животноводства. Был разработан ряд рекомендаций и специальных мер для принятия сторонами.



ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ УБСУНУРСКОГО МИГРАЦИОННОГО ОЧАГА РЕСПУБЛИКИ ТЫВА

М.С. Волков¹, А.В. Варкентин², В.Н. Ирза³, И.А. Чвала⁴, А.Э. Меньщикова⁵,
А.В. Андриясов⁶, М.А. Циванюк⁷, Ч.Б.-О. Оюн⁸, С.В. Роголев⁹, М.Ш.-О. Арапчор¹⁰

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

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

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

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

⁵ руководитель сектора, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: menschikova@arriah.ru

⁶ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

⁷ научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: tsivanuk@arriah.ru

⁸ заместитель начальника отдела внутреннего ветеринарного надзора территориального управления РСХН по Республикам Хакасия и Тыва, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

⁹ инспектор территориального управления РСХН по Республикам Хакасия и Тыва, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

¹⁰ заместитель руководителя территориального управления РСХН по Республикам Хакасия и Тыва, e-mail: rsnkhakasia@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты многолетних мониторинговых исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» российской части акватории озера Убсу-Нур Республики Тыва на предмет выявления циркуляции вируса гриппа типа А в популяциях диких перелетных птиц. Определена экологическая и биологическая значимость прибрежной территории озера в организации эпидемиологических исследований. Установлена циркуляция вируса высокопатогенного гриппа птиц в популяциях дикой орнитофауны на территории убсунурского миграционного очага.

Ключевые слова: грипп птиц, ньюкаслская болезнь, дикая перелетная птица, озеро, эпизоотия, вспышка, природный очаг, миграция.

ВВЕДЕНИЕ

Соленое бессточное озеро Убсу-Нур находится в тектонической впадине — северо-восточной части Котловины Больших озер, которая насчитывает большое количество пресноводных и соленых водоемов. Российский сектор озера расположен на юге Республики Тыва с протяженностью береговой линии около

10 км. Климат котловины является резко континентальным с существенными колебаниями суточных и годовых температур.

Объект исследования выбран не случайно, хозяйственная деятельность человека в исследуемом районе ограничивается пастбищным скотоводством, а слабое антропогенное воздействие на экосистему и фаунистический комплекс котловины определили разнообразие орнитофауны, которая представлена здесь 376 видами птиц, из которых 308 — гнездящиеся. Наибольшая часть пролетных видов представлена отрядами ржанкообразных, гусеобразных и воробьеобразных, которые при миграции по Центрально-Азиатскому пролетному пути останавливаются на озерах котловины. Водоемы Убсунурской котловины в летний период представляют места концентрации огромного количества водоплавающих и околоводных птиц с максимальной площадью заселения прибрежных зон озера Убсу-Нур ввиду наличия обширных тростниковых зарослей и высокой кормности озера [4]. «Необитаемость» прибрежной части озера, заболоченные берега с обширными тростниковыми зарослями, кормовая база (алтайский осман) привлекают диких перелетных



птиц и определяют постоянные места гнездования пернатых.

Необходимо отметить, что большое количество гнездящихся и залетных видов птиц Убсунурского биотопа занесено в Красную книгу Российской Федерации [4]. Данный факт ограничивает возможность проведения активного мониторинга на территории озера, однако губительные эпизоотии высокопатогенного гриппа не щадят ни классические, ни редкие, ни реликтовые виды птиц и разрушают устойчивую орнитофаунистическую систему котловины [5]. Примером данного утверждения могут служить результаты наблюдения доктора А.П. Савченко, по данным которого в 2006 г. на озере преимущественным видом погибших птиц стала чомга (*Podiceps cristatus*), плотность гнездования которой

достигала 2,0 тыс. пар на 1 км². Массовый падеж и распространение инфекции на другие виды совпали со временем достижения большей части птенцов чомги 12–14-суточного возраста. Савченко А.П. указывает на ощутимые экологические последствия эпизоотии гриппа в популяции диких птиц озера Убсу-Нур, только с 2008 по 2009 гг. произошло резкое сокращение их обилия (от 3,5 до 10 крат). При этом ученый отмечает, что на большинстве водоемов юга Центральной Сибири исчезла лысуха, резко уменьшились популяции красноголовой чернети и чирка-трескунка [5].

Учитывая сложную эпизоотическую и эпидемиологическую ситуацию в мире, разнообразие подтипов вируса гриппа А, выделяемых от разных видов диких птиц, проведение комплексного активного и пассивного мониторинга в популяциях диких водоплавающих птиц является актуальной и важной задачей практи-

Колонии водоплавающих птиц над местами гнездований (май, 2015)





Обмеление озера Убсу-Нур (май, 2015)

ческой ветеринарной, биологической и медицинской наук, которая направлена на сохранение здоровья человека и стабилизацию социально-экономических последствий в результате вспышек заболевания.

Целью данной работы явился анализ результатов многолетних мониторинговых исследований российской части акватории озера Убсу-Нур Республики Тыва на предмет выявления циркуляции вируса гриппа типа А в популяциях диких перелетных птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспедиции в Республику Тыва на озеро Убсу-Нур организованы в соответствии с планом реализации государственного мониторинга. В качестве биологического и патологического материала отбирали пробы помета (пуловые пробы), участок кишечника и мозга от мертвых птиц, кровь для последующего получения сыворотки [1]. При отборе образцов для исследований проводили идентификацию вида с использованием определителей видов птиц [6, 7]. Доставку материала в лабораторию осуществляли в герметичных влагонепроницаемых термоконтейнерах с наличием аккумуляторов холода в соответствии с действующими нормами. Лабораторные исследования проводили в соответствии с «Ветеринарными правилами лабораторной диагностики гриппа А птиц» и Рекомендациями по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных МЭБ [1, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В июне 2006 г. на озере Убсу-Нур Овюрского района Республики Тыва Российской Федерации была зарегистрирована массовая гибель дикой водоплавающей птицы. Общее количество мертвых птиц составило 3749 голов, преобладающим видом была чомга (*Podiceps cristatus*). Результаты вирусологических и молекулярно-биологических исследований показали, что

причиной массового падежа стал вирус высокопатогенного гриппа птиц типа А подтипа H5N1.

Во второй половине июня 2009 г. в прибрежной части российской территории озера было обнаружено 58 голов мертвых птиц следующего видового состава: чомга (*Podiceps cristatus*), гусь гуменник (*Anser fabalis*), колпица (*Platalea leucorodia*), черноголовый хохотун (*Larus ichthyaetus*). Превалирующим видом птиц, у которых генетический материал вируса гриппа H5N1 был выделен в большинстве проб, стала чомга.

В июне 2010 г. на озере случай массовой гибели диких водоплавающих птиц повторился — пало 367 голов, причина — высокопатогенный грипп типа А подтип H5N1. Видовой состав представителей орнитофауны: чомга (*Podiceps cristatus*), крохаль (*Mergus merganser*), серая цапля (*Ardea cinerea*), колпица (*Platalea leucorodia*), серая утка (*Anas strepera*), баклан (*Phalacrocorax carbo*), лысуха (*Fulica atra*), белая цапля (*Egretta alba*), красноголовый нырок (*Aythya ferina*).

По данным доктора М.Ю. Щелканова, вспышка гриппа в популяции диких птиц озера в 2009 г. была этиологически связана с вирусом высокопатогенного гриппа птиц H5N1 уссурийского генотипа — 2.3.2 (Приморский край). Проникновение инфекционного начала произошло из Юго-Восточной Азии вдоль Джунгарского миграционного русла. Однако «убсунурский» вирус 2006 г. имел иное происхождение. Так, молекулярно-генетический анализ показал близость возбудителя с индо-пакистанскими штаммами и дистантность от цинхайских изолятов, на основании чего следует полагать, что занос вируса на озеро Убсу-Нур первоначально произошел с полуострова Индостан вдоль восточного ответвления Индо-Азиатского миграционного русла [8].

Следует подчеркнуть, что прослеживается строгая сезонность периодов массовой гибели птиц на озере Убсу-Нур, все случаи произошли в июне месяце.

Несмотря на то, что в 2011 и 2012 гг. на территории озера случаев гибели птиц зарегистрировано не было,

специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» совместно с сотрудниками регионального Россельхознадзора ежегодно проводились активные мониторинговые исследования в прибрежных районах озера Убсу-Нур в связи с ранее неблагоприятной эпизоотической обстановкой по высокопатогенному гриппу птиц. В 2011 г. было исследовано 243 пробы сывороток крови и 112 проб патологического материала от диких и синантропных птиц. В результате исследований в 2 пробах сывороток крови от чомги (*Podiceps cristatus*) в РТГА выявлены специфические антитела к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в диагностически значимых титрах (4,0–5,0 log₂). Кроме того, в 11 пробах от диких птиц определены антитела в титрах 2,0–3,0 log₂ к вирусу подтипов H5 и H7. Антитела на уровне ниже диагностического титра были выявлены в сыворотках крови от коршуна (*Milvus migrans*) (H5/H7), чомги (*Podiceps cristatus*) (H7), серой утки (*Anas strepera*) (H7), чайки озерной (*Larus ridibundus*) (H7) и большого баклана (*Phalacrocorax carbo*) (H7).

В 2012 г. при исследовании 124 проб сывороток крови и 79 проб образцов патологического материала от домашних, диких и синантропных птиц, отобранных на территории Республики Тыва, генетического материала и специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипов H5 и H7 не обнаружено.

При мониторинговых исследованиях 2013 г. в сыворотках крови диких птиц (чайка, баклан, серая утка) выявлены антигемагглютинины к вирусу гриппа подтипа H5.

В 2014 г. при исследовании в РТГА 50 проб сывороток крови от диких водоплавающих птиц выявлено 24 положительных результата. Специфические антигемагглютинины к H5 обнаружены в 1 пробе (малая чайка), к подтипу H7 — в 16 пробах (малая чайка, черноголовый хохотун, баклан) и к подтипу H9 — в 10 пробах (малая чайка, черноголовый хохотун). Факт выявления

специфических антител у диких птиц свидетельствует о циркуляции вируса гриппа подтипов H5, H7 и H9 в их популяции и представляет реальную угрозу для промышленного птицеводства Российской Федерации и экологической стабильности биотопа. Из 24 проб биологического материала была выделена РНК вируса гриппа типа А, однако при постановке ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на ген H5, H7 и H9 видовая специфичность к данным подтипам была исключена. В одной пробе от дикой утки-широконоски методом ОТ-ПЦР-РВ был идентифицирован подтип H3.

В конце мая 2015 г. специалисты ФГБУ «ВНИИЗЖ» совместно с государственными инспекторами территориальных управлений Россельхознадзора по Республикам Хакасия и Тыва в сопровождении сотрудников Росприроднадзора провели обследование акватории российской стороны озера Убсу-Нур и активный мониторинг популяции диких птиц на предмет вирусносительства возбудителей особо опасных болезней (грипп птиц, ньюкаслская болезнь). На побережье озера найдены мертвыми 2 головы большой поганки и 2 крачки. В результате вирусологических исследований от павших птиц был выделен вирус гриппа А/H5N1. При проведении сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Н длиной 258 н. было установлено, что исследуемые изоляты принадлежат к азиатской генетической линии вируса высокопатогенного гриппа птиц (линия A/Guandong/1/96, клада 2.3.2.1). По фрагменту гена Н к выявленным изолятам наиболее близкими оказались последовательности вирусов гриппа А птиц подтипа H5N1, выделенных в Алтайском крае в 2014 г. (99,61–99,22% совпадений) и Астраханской области в 2015 г. (98,44–98,04% совпадений), а также последовательности изолятов вируса гриппа А птиц подтипа H5N1, выделенных в Китае, Индонезии и Вьетнаме в 2012–2014 гг. (98,83–98,04% совпадений).

В 3 образцах сывороток крови от диких птиц выявлены антитела к возбудителю ньюкаслской болезни

Кулики на отмели (май, 2015)





Затопленное гнездо ржанкообразных (май, 2015)

в диагностически значимых титрах (баклан — $6,0 \log_2$, лысуха — $3,0 \log_2$, баклан — $3,0 \log_2$).

Настораживает факт уменьшения площади зеркала озера в связи с его высыханием (по данным 3 лет), что может сказаться на «пластичности» орнитокомплекса озера.

Отсутствие случаев регистрации гибели птиц в период 2007–2008 гг. не может служить основанием для суждения об отсутствии циркуляции разных подтипов вируса гриппа в популяции дикой авифауны.

Основным видом птиц, пострадавшим от эпизоотий высокопатогенного гриппа на озере, была чомга (большая поганка, *Podiceps cristatus*).

Учитывая тенденцию к обмелению озера и свойственную птицам колониальность, увеличение плотности диких перелетных птиц на ограниченной и с каждым годом уменьшающейся территории может привести к развитию широкой эпизоотии и гибели популяции редких и реликтовых видов птиц.

До сих пор остается дискуссионным вопрос о природной очаговости гриппа птиц. Многие авторы относят грипп к природно-очаговому нетрансмиссивным заболеваниям. Является ли прибрежная часть территории озера Убсу-Нур, где гнездится колоссальное количество диких птиц, представляющих резервуар инфекции, природным очагом заболевания? Учитывая тот факт, что природная очаговость свойственна не только трансмиссивным заболеваниям, дискуссия о природе гриппа является актуальным вопросом. Для ответа на него необходимо четко определить критерии природной очаговости и сопоставить с ними эпидемиологические характеристики гриппа в популяции диких птиц озера. Характерными для природного очага элементами являются природный резервуар возбудителя, сезонность заболевания и территориальность (географический ландшафт). В соответствии с данными критериями на территории озера Убсу-Нур поддерживается природный очаг высокопатогенного гриппа

H5N1: дикие птицы водного и околоводного комплекса являются природным резервуаром возбудителя, где поддерживается его циркуляция и обеспечивается существование вируса как биологического вида; выполняется и условие сезонности заболевания, так как места гнездования и зимовок для мигрирующих видов птиц не совпадают, что не противостоит концепции «подвижности (плавучести)» природных очагов; территория предполагаемого природного очага определена гнездовым ареалом диких перелетных птиц и мест кормежек [2]. Природно-климатические условия Убсунурской котловины являются оптимальными для обеспечения циркуляции вируса в дикой орнитофауне и его эволюции. Дискуссионным остается вопрос и о сохранении вируса в сезонном очаге во время зимы. Существуют доказательства накопления вируса гриппа в организмах гидробионтов, в частности мидий и дафний, обитающих в природных озерах и реках. Результаты исследований зарубежных ученых показали, что в мидиях *Dreissena polymorpha* вирус не только переживает длительное время, но и накапливается [9, 11]. Изоляция вируса H5 из неконцентрированной воды

Гнездо бакланов, птенцы (июнь, 2013)



Семья бакланов (июнь, 2013)

и гидробионтов является логическим процессом приспособления существования вируса в данном биотопе ввиду сложившегося фекально-орального механизма заражения при гриппе, когда вирус выделяется с пометом диких птиц в окружающую среду, чаще всего воду, и переживает там длительное время. Гипотеза длительного сохранения вируса в воде озер была подтверждена японскими вирусологами Университета Хоккайдо при изучении циркуляции вируса гриппа в популяциях водно-болотных и околоводных птиц в Якутии [3].

По мнению академика Д.К. Львова, на всем протяжении миграционного пути, как в местах гнездований, так и в районах остановок, зимовок и т.п., касательно гриппа птиц формируются временные «миграционные» очаги заболевания и поддерживается циркуляция патогена [2].

Синантропные виды птиц являются своеобразным вектором передачи вируса между резервуаром инфекции в дикой авифауне и восприимчивой домашней птицей. Однако, ввиду того что в близлежащих районах озера Убсу-Нур местные жители занимаются исключительно пастбищным скотоводством и не практикуют разведение птицы, вспышек гриппа среди домашней птицы не регистрируют, т.к. отсутствует восприимчивый организм, нахождение которого в природном очаге привело бы к неминуемому заболеванию.

Ледоход на озере — опасное время для мониторинга (апрель, 2014)



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая анализ результатов мониторинговых исследований, следует подчеркнуть, что озеро Убсу-Нур играет важную роль не только как место остановки, кормежек и гнездования диких птиц, но и как «индикатор» заноса вируса на территорию Российской Федерации во время сезонных миграций по Центрально-Азиатскому и Восточно-Азиатскому коридорам и представляет ценный научный интерес в изучении экологии вируса гриппа птиц.

Установлена циркуляция вируса высокопатогенного гриппа птиц в популяциях дикой орнитофауны на территории убсунурского миграционного очага.

С учетом организованных экспедиций на озеро Убсу-Нур Республики Тыва Российской Федерации и полученных результатов, оптимальным временем проведения мониторинговых исследований в дикой авифауне района следует считать конец мая — начало июня.

Экспедиция проведена за счет средств по контракту с МАГАТЭ №17547/R0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветеринарные правила лабораторной диагностики гриппа А птиц: Приказ МСХ РФ от 3.04.2006 г. № 105 // Вет. консультант. — 2006. — № 12. — С. 8–9.
2. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. Эколого-географические связи птиц с возбудителями инфекции. — М.: Наука, 1979. — 270 с.
3. Международное сотрудничество по изучению и охране птиц Якутии: основные итоги, новые подходы и технологии / Н.И. Гермогенов, Н.Г. Соломонов, А.Г. Дегтярев [и др.] // Птицы Сибири: структура и динамика фауны, населения и популяций / под ред. Л.Г. Вартапетова. — М., 2011. — С. 289–310.
4. Озерская Т.П. Структура населения и экология птиц Убсу-Нурской котловины: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2008. — 21 с.
5. О циркуляции вирусов гриппа А и падеже птиц на юге Центральной Сибири / А.П. Савченко, В.И. Емельянов, П.А. Савченко [и др.] // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. — 2012. — № 5 (87). — С. 310–315.
6. Полевой определитель гусеобразных птиц России / Н.Д. Поярков, А.В. Кондратьев, К.Е. Литвин [и др.]. — М., 2011. — 223 с.
7. Рябицев В.К. Птицы Урала, Приуралья и западной Сибири. — Екатеринбург, 2008. — 634 с.
8. Щелканов М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005–2009 гг.): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2010. — 53 с.
9. Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) / P. Stumpf, K. Failing, N. Papp [et al.] // Avian Dis. — 2010. — Vol. 54 (4). — P. 1183–1190.
10. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Avian influenza / OIE. — Paris, France, 2014. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
11. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna* / B.W. Meixell, M.A. Borchardt, S.K. Spencer // Appl. Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 79 (23). — P. 7249–7255.

STUDY OF AVIAN INFLUENZA VIRUS CIRCULATION IN UVS-NUUR BIRD MIGRATION AREA IN REPUBLIC OF TYVA

M.S. Volkov¹, A.V. Varkentin², V.N. Irza³, I.A. Chvala⁴, A.E. Menshikova⁵,
A.V. Andriyasov⁶, M.A. Tsivanyuk⁷, Ch.B.-O. Oyun⁸, S.V. Rogolyov⁹, M.Sh.-O. Arapchor¹⁰

¹ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Science), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: volkov_ms@arriah.ru

² Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: varkent@arriah.ru

³ IAC Chief Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: irza@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ Head of Sector, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: menshikova@arriah.ru

⁶ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

⁷ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: tsivanuk@arriah.ru

⁸ Deputy Head of the Department for Internal Veterinary Surveillance of the Territorial Rosselkhoznadzor Administration for the Republic of Khakassia and Tyva, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

⁹ Inspector of the Territorial Rosselkhoznadzor Administration for the Republic of Khakassia and Tyva, e-mail: tuvshn_ozg@mail.ru

¹⁰ Deputy Head of the Rosselkhoznadzor Territorial Administration for Republic of Khakassia and Tyva, e-mail: rsnkhakassia@mail.ru

SUMMARY

The paper demonstrates results of long-term monitoring research performed by the FGBI "ARRIAH" in the Russian part of Uvs-Nuur Lake water area in the Republic of Tyva. The monitoring was aimed at the detection of influenza A virus circulation in the population of wild migratory birds. Ecological and biological significance of the lake coastal area in the arrangement of epidemiological investigations was determined. Highly pathogenic avian influenza virus circulation was identified in populations of wild avifauna in Uvs-Nuur migration area.

Key words: avian influenza, Newcastle disease, migratory wild bird, lake, epidemics, outbreak, natural reservoir, migration.

INTRODUCTION

Closed salted Uvs-Nuur Lake is located in the tectonic depression in the north-east part of the Uvs-Nuur basin comprising a great number of saline and fresh-water bodies. The Russian part of the lake is located in the south of the Republic of Tyva and its coastline is spread for about 10 km. The climate in the basin is highly continental with significant daily and seasonal temperature variations.

The choice of the study object was not accidental. The economic activities of the local population are limited by pastoral animal breeding thus weak impact on the ecosystem and fauna of the basin is resulted in various avifauna represented by 376 bird species including 308 nesting bird

species. The majority of transient birds include charadriiformes, anseriformes and passeriformes who stop on the lakes of the Uvs-Nuur basing during their migration along the Central Asian migration route. The water bodies of the Uvs-Nuur basin harbor a great number of waterfowl and semi-aquatic birds with the highest density of stocking in the coastal areas of Uvs-Nuur Lake due to vast reed areas and high feed capacities of the lake [4]. "Desolated" coastal area, lake swamp plain and vast reed grounds as well as feed capacities (Altai osman) attract the birds and these factors also predetermine the fixed nesting areas.

It should be pointed out that the majority of nesting and transient bird species of the Uvs-Nuur biotype are enlisted in the RF list of endangered species [4]. This fact significantly limits the capabilities for active monitoring of the lake but devastating epidemics caused by highly pathogenic avian influenza do not have mercy upon either classical or rare or extinct bird species and they destroy the stable avifauna system in the basin [5]. This statement can be supported by the results of the observations made by A.P. Savchenko, who states that great-crested grebe (*Podiceps cristatus*) was dominating bird species among those dead on the lake in 2006 and its nesting density amounted to 2.0 ths couples per 1 km². Mass deaths and spread of the infection to other species occurred at the time when the majority of great-crested grebe chicks reached 12-15-day-old age. Savchenko A.P. highlights notable ecological effects of the influenza epidemics for wild bird population on Uvs-Nuur Lake. Just during the period from 2008 to 2009 their abundance sharply decreased (by 3.5-10-fold). Here-

with, the researcher mentions that coot became extinct on the majority of the water bodies in the south part of Central Siberia and dramatically decreased the population of common pochards and garganey teals [5].

In view of the complicated global epizootic and epidemic situation, diversity of influenza A virus subtypes isolated from different bird species, complex active and passive monitoring in wild waterfowl populations is a topical and important task for practical veterinary, biological and medical sciences that is aimed at human health preservation and control of social and economic consequences of the disease outbreaks.

This work was aimed at the analysis of the results of long-term monitoring research performed in the Russian part of Uvs-Nuur Lake water area in the Republic of Tyva for the detection of influenza A virus circulation in wild migratory bird population.

MATERIALS AND METHODS

Missions to the Republic of Tyva were organized under the plan of national monitoring. Biological and pathological samples included samples of feces (pooled samples), part of intestine and brain from dead birds and blood for sera [1]. During sampling bird species were identified using bird species indicators [6, 7]. The samples were delivered to the laboratory in sealed water-proof thermal containers with cold accumulators. The samples were transported compliant to current specifications. The laboratory tests were performed according to the Veterinary Rules for Laboratory Diagnosis of Avian Influenza A and OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [1, 10].

RESULTS AND DISCUSSION

In June 2006, mass deaths of wild waterfowl were reported on Uvs-Nuur Lake in Ovyursky Raion, Republic of Tyva, Russian Federation. Total number of dead birds

amounted to 3749, the dominated species – great-crested grebe (*Podiceps cristatus*). Virological and molecular-biological test results demonstrated that the mass deaths were caused by highly pathogenic avian influenza A virus of subtype H5N1.

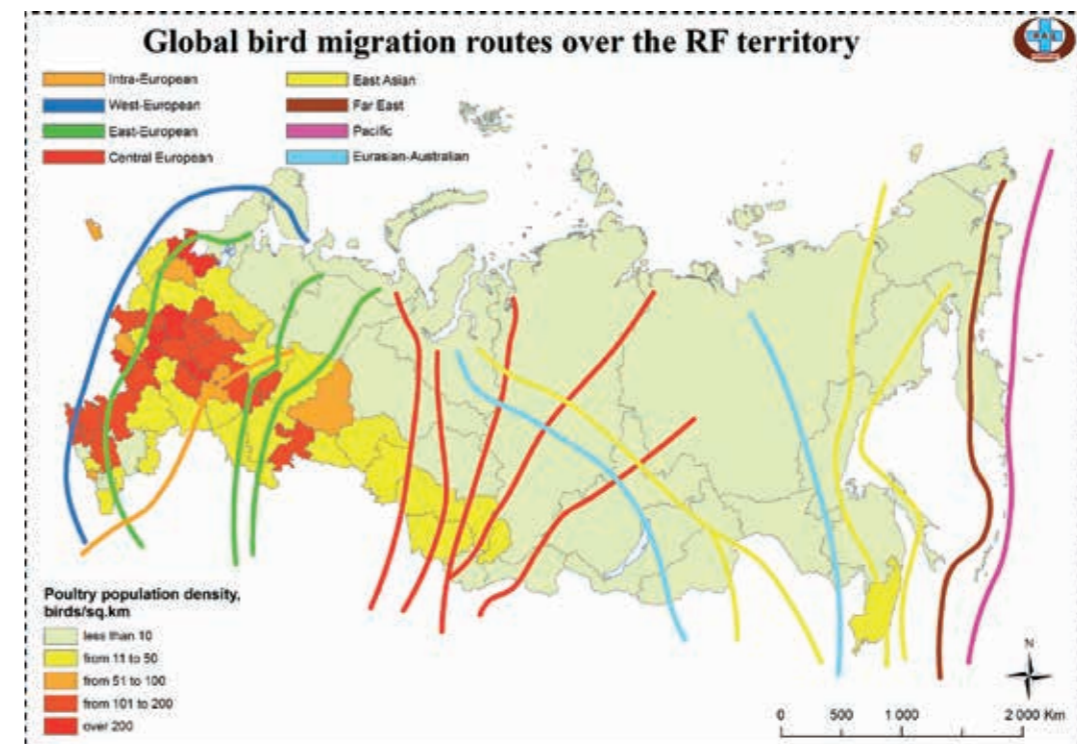
In the second half of June, 2009, 58 dead birds were found on the coastal part of the lake. The bird species included great-crested grebe (*Podiceps cristatus*), bean goose (*Anser fabalis*), spoonbill (*Platalea leucorodia*) and great black-headed gull (*Larus ichthyæetus*). Great-crested grebe was the dominating species from whose samples H5N1 influenza virus genetic material was recovered.

In June, 2010, mass mortality of wild waterfowl was again reported on the lake. 367 birds died and the cause of death was highly pathogenic H5N1 avian influenza. The involved avifauna species included great-crested grebe (*Podiceps cristatus*), goosander (*Mergus merganser*), grey heron (*Ardea cinerea*), spoonbill (*Platalea leucorodia*), gadwall (*Anas strepera*), cormorant (*Phalacrocorax carbo*), coot (*Fulica atra*), egret (*Egretta alba*), common pochard (*Aythya ferina*).

According to Dr. M.Yu. Schelkanov, in 2009 the influenza outbreak in wild bird population was etiologically related to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus of Ussuriysk genotype 2.3.2 (Primorsky Krai). The infectious agent was introduced from South-East Asia along the Dzungarian migration route. However, "Uvs-Nuur" virus of 2006 was of different origin. Thus molecular-genetic analysis demonstrated the agent's relatedness to India-Pakistan strains and its distinction from Qinghai isolates that suggests the virus being originally introduced to Uvs-Nuur Lake from Hindostan along the India-Asian migration route [8].

Strict seasonality of birds' mass deaths on Uvs-Nuur Lake should be emphasized as all cases occurred in June.

In spite of the fact that there were no birds' mortality reported on the lake in 2011 and 2012, the FGBI "ARRIAH" experts along with the regional Rosselkhoznadzor offic-





Waterfowl colonies over their nesting sites (May, 2015)

ers annually performed active monitoring research in the coastal regions of Uvs-Nuur Lake due to previous unfavorable situation on highly pathogenic avian influenza epidemic. In 2011, 243 blood samples and 112 pathological samples from wild and synanthropic birds were tested. The test results demonstrated diagnostically relevant titers of HI A1 H5 virus antibodies ($4.0-5.0 \log_2$) in 2 sera samples from great-crested grebes (*Podiceps cristatus*). In addition, 11 samples from wild birds demonstrated H5H7 virus antibody titers of $2.0-3.0 \log_2$. Antibodies at a level below diagnostic one were detected in blood sera from black kite (*Milvus migrans*) (H5/H7), great-crested grebe (*Podiceps cristatus*) (H7), gadwall (*Anas strepera*) (H7), black-headed gull (*Larus ridibundus*) (H7) and great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) (H7).

In 2012, no genetic material or H5 and H7 avian influenza virus specific antibodies were detected in 124 sera and 79 pathological samples collected from domestic, wild and synanthropic birds in the Republic of Tyva.

Shallowing of Uvs-Nuur Lake (May, 2015)



In 2013, monitoring research demonstrated avian influenza H5 virus antihemagglutinins were detected in sera of wild birds (gull, cormorant, gadwall).

In 2014, HI tests of 50 serum samples collected from wild waterfowl demonstrated 24 positive results. Specific H5 virus antihemagglutinins were detected in 1 sample (little gull), H7 virus antihemagglutinins were identified in 16 samples (little gull, great black-headed gull, cormorant), H9 virus antihemagglutinins – in 10 samples (little gull, great black-headed gull). Detection of specific antibodies in wild birds suggests H5, H7 and H9 virus circulation in their populations and poses real risk for the RF commercial poultry industry and ecological integrity of the biotope. In 24 biological samples influenza A virus RNA was isolated but in real-time RT-PCR with H5, H7 and H9-specific genetic primers the species specificity to these subtypes was excluded. Subtype H3 virus was identified using real-time RT-PCR in one sample from shoveler.

In the end of May 2015, the FGBI "ARRIAH" experts, officers from the Territorial Rosselkhozadzor Administrations for the Republics of Khakassia and Tyva and Rospotrebnadzor officials investigated the Russian party of Uvs-Nuur water area and performed active monitoring of



Sandpipers in the shallow water (May, 2015)

wild bird population for highly dangerous disease virus carrying (avian influenza, Newcastle disease). Two dead great-crested grebes and 2 dead mallards were found on the coast. Virological tests allowed isolation of influenza A/H5N1 virus from the dead birds. Comparative analysis of 258-nt sequences of H gene demonstrated that the tested isolates belonged to the Asian genetic lineage of highly pathogenic avian influenza (A/Guangdong/1/96 lineage, clade 2.3.2.1). According to H gene fragment the most closely related to the recovered isolates were the sequences of avian influenza A H5N1 viruses isolated in Altay Krai in 2014 (99.61-99.22% identity) and in China, Indonesia and Vietnam in 2012-2014 (98.83-98.04% identity).

Three serum samples from wild birds demonstrated diagnostically relevant titers of antibodies to Newcastle disease agent (cormorant – $6.0 \log_2$, coot – $3.0 \log_2$, cormorant – $3.0 \log_2$).

Concerns raise the reduction of the water table of the lake due to its drying (data over the past 3 years) that can affect the "flexibility" of the avicomplex on the lake.

Absence of reported dead birds in 2007-2008 cannot ground the statement on the absence of circulation of influenza viruses of different subtypes in the population of wild avifauna.

The dominating species suffered from highly pathogenic avian influenza on the lake was grebe (great-crested grebe, *Podiceps cristatus*).

In view of the tendency of the lake's shallowing and due coloniality typical for birds, the increase of migratory bird density on a limited and annually reducing territory can result in vast epidemics and death of rare and extinct bird species.

The issue of the avian influenza natural nidality has been under discussion until now. Many researchers consider influenza to be a naturally nidal non-transmissible disease. Can the coastal area of Uvs-Nuur Lake, where a huge amount of wild birds nest, be the disease natural nidus? Given that natural nidality is typical not only for transmissible diseases, the discussion of influenza nature is a topical question. In order to answer it, criteria of natural nidality should be clearly defined and compared to influenza epidemic properties in wild bird population on the lake. Natural agent's reservoir, disease seasonality and territoriality (landscape) are typical for the natural nidus. According to these criteria, natural nidus of highly pathogenic H5N1 influenza virus has been maintained on

Uvs-Nuur Lake: wild aquatic and semi-aquatic birds are the natural reservoir of the agent, where its circulation is maintained and the virus existence as a biological species is provided; the disease seasonality is also observed here as nesting and wintering sites are different that does not go against the concept of "mobility (buoyancy)" of natural niduses; the territory of the supposed natural nidus is shaped by the wild migratory bird nesting areas and feeding sites [2]. Natural and climatic conditions in the Nvs-Nuur basin are optimal for the virus circulation maintenance in the wild avifauna and for its evolution. The issue of the virus persistence in the seasonal nidus during winter is still to be discussed. There are facts of influenza virus accumulation in such aquatic organisms as mussels and daphnids inhabiting natural lakes and rivers. Foreign test results demonstrated that in *Dreissena polymorpha* mussels the virus not only survives for a long time but also accumulates [9, 11]. H5 virus isolation from non-concentrated water and aquatic organisms demonstrates the logical process of the virus adaptation to the survival in this biotope due to fecal-oral influenza infection route when the virus is shed in the environment, mostly in the water, with the wild bird feces and persists there for a long time. The hypothesis of long persistence of the virus in lake water was supported by Japanese virologists of the Hokkaido University who investigated the influenza virus circulation in the populations of wetland and semi-aquatic birds in Yakutia [3].

Flooded nest of Charadriiformes (May, 2015)





Cormorant family (June, 2013)

D.K. Lvov considers that temporary "migratory" disease outbreaks are formed along the migration route areas both in the nesting areas and in the resting or wintering areas, etc. and the agent's circulation is maintained [2].

Synanthropic birds are a specific vector of the virus transmission between the virus reservoir in the wild avifauna and susceptible birds. However, due to the fact that in the Uvs-Nuur adjacent areas local community is occupied solely with pastoral farming and do not raise poultry, no outbreaks are being reported in poultry as there is no susceptible organism whose presence in the natural nidus would have resulted in unavoidable disease.

CONCLUSION

While summing up the monitoring research results one should emphasize that Uvs-Nuur Lake plays an important role not only as a resting, feeding and nesting area for wild birds but also as an "indicator" of the virus introduction into the Russian Federation during its seasonal migrations along the Central-Asian and East-Asian routes thus being of the utmost interest for examination of the avian influenza virus ecology.

Highly pathogenic avian influenza virus circulation was confirmed in the populations of wild avifauna in Uvs-Nuur migration nidus.

With due regard of the missions sent to Uvs-Nuur Lake, Republic of Tyva, Russian Federation and their results, late

Ice drift on the lake – dangerous period for monitoring (April, 2014)



Cormorant nest, chicks (June, 2013)

May-early June should be considered the optimal time for the wild avifauna monitoring.

The missions were funded under the IAEA Project No. 17547/RO.

BIBLIOGRAPHY

1. Veterinary rules for avian influenza A laboratory diagnosis: MoA Order of 3.04.2006 No. 105 // Vet. Consultant. – 2006. – No. 12. – P. 8–9.
2. D.K. Lvov, V.D. Ilyichev Bird migrations and transmission of infectious agents. Ecological and geographic interrelations between birds and infectious agents. – M.: Nauka, 1979. – 270 p.
3. International cooperation for examination and preservation of birds in Yakutia: basic results, new approaches and methods / N.I. Germogenov, N.G. Solomonov, A.G. Degtarev [et al] // Birds of Siberia: structure and dynamic of fauna, bird habitat and population/ edited by L.G. Vartapetov. – M., 2011. – P. 289–310.
4. T.P. Ozerskaya Habitat structure and ecology of birds in Uvs-Nuur basin: Author's abstract of the dissertation ... Candidate of Science (Biology). – M., 2008. – 21 p.
5. Influenza A virus circulation and bird mortality in the south of Central Siberia/ A.P. Savchenko, V.I. Yemelyanov, P.A. Savchenko [et al] // VSNC CO RAMN Proceeding. – 2012. – No. 5 (87). – P. 310–315.
6. Russia's Anseriformes field indicator / N.D. Poyarkov, A.V. Kondratyev, K.Ye. Litvin [et al]. – M., 2011. – 223 p.
7. V.K. Ryabintsev Birds of the Urals, Transurals and West Siberia. - Yekaterinburg, 2008. – 634 p.
8. M.Yu. Schelkanov Evolution of highly virulent influenza A (H5N1) virus in Northern Eurasia ecosystems (2005–2009): Author's abstract of the dissertation ... Doctor of Science (Biology). – M., 2010. – 53 p.
9. Accumulation of a low pathogenic avian influenza virus in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) / P. Stumpf, K. Failing, N. Papp [et al.] // Avian Dis. – 2010. – Vol. 54 (4). – P. 1183–1190.
10. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Avian influenza / OIE. – Paris, France, 2014. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
11. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna* / B.W. Meixell, M.A. Borchardt, S.K. Spencer // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79 (23). – P. 7249–7255.

УДК 619:616.98:578.828.11:636.52/58:616-078

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА ПТИЦ

С.П. Лазарева¹, М.А. Волкова², Н.С. Мудрак³, И.А. Чвала⁴, Т.В. Жбанова⁵

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

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

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

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

⁵ заведующий аспирантурой, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhbANOVA@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе иммуноферментного метода для выявления антител к вирусу лейкоза птиц (ALV) при тестировании сывороток в одном разведении. Титр антител определяли по S/P отношению, измеренному в одном рабочем разведении сыворотки (1:400). Разработанная тест-система показала высокую специфичность и чувствительность в сравнении с импортным коммерческим набором.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, иммуноферментный анализ, антиген, антитело.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкозы птиц широко распространены в промышленном птицеводстве. Возбудителями лейкозов птиц являются вирусы (ALV), принадлежащие к семейству *Retroviridae*, роду *Alpharetrovirus*. ALV подразделяются на 6 антигенных подгрупп: А, В, С, D, Е, J, которые, в свою очередь, имеют в своем составе множество штаммов. Имеются данные, доказывающие возможность перекрестной нейтрализации между ALV-A и ALV-J по капсидному антигену р27, общему для всех подгрупп [4]. Экономический ущерб от ALV связан, как правило, с гибелью от вторичных инфекций и неопластических заболеваний, а также со снижением ряда производственных показателей, включая продукцию яиц и их качество. ALV способны вызывать целый ряд неопластических заболеваний, таких как лимфоидный лейкоз, миелобластоз, миелоидный лейкоз, глиомы, остеопетроз, гемангиомы и т.д. Клинические признаки заболевания проявляются у кур в возрасте старше 100 сут. [3, 5, 7].

Диагностируют заболевание по результатам лабораторных и патоморфологических исследований. Антитела к ALV периодически выявляют в образцах сывороток крови кур, поступающих как из яичных, так и из бройлерных птицефабрик Российской Федерации

(РФ) [2]. Данный факт свидетельствует о циркуляции вируса среди коммерческого поголовья птицы. Запатентованных вакцин против ALV на сегодняшний день не существует. Исходя из этого, борьба с инфекцией осуществляется путем комплектования племенного стада из хозяйств, благополучных по лейкозу птиц. Одним из способов достижения данного результата является проведение регулярного серологического мониторинга поголовья птицы с последующей выбраковкой и уничтожением больных особей [7].

В серологической диагностике ALV различных подгрупп на территории РФ в настоящее время используются коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА), выпускаемые фирмами Zoetis, IDEXX (США). В РФ подобных тест-систем не разработано. Таким образом, разработка отечественных иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ALV является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Штамм ALV-J/CLB-908U, выделенный в 2009 г. из патологического материала, поступившего из птицефабрики Челябинской области [1]. Штамм депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». В работе использовали культуральную вирусосодержащую жидкость 3 пассажа с титром инфекционной активности 5,5 Ig ЭД₅₀/см³. Культивирование вируса проводили на первично-трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур.

Антиген. Препарат антигена ALV получили согласно разработанному ранее методу [1]. Для определения концентрации типоспецифического антигена ALV в вирусосодержащих материалах использовали коммерческий набор «Avian leukosis virus antigen test kit» (Synbiotics, США) по инструкции производителя.

Электрофорез. Очищенный концентрированный антиген исследовали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле [6].

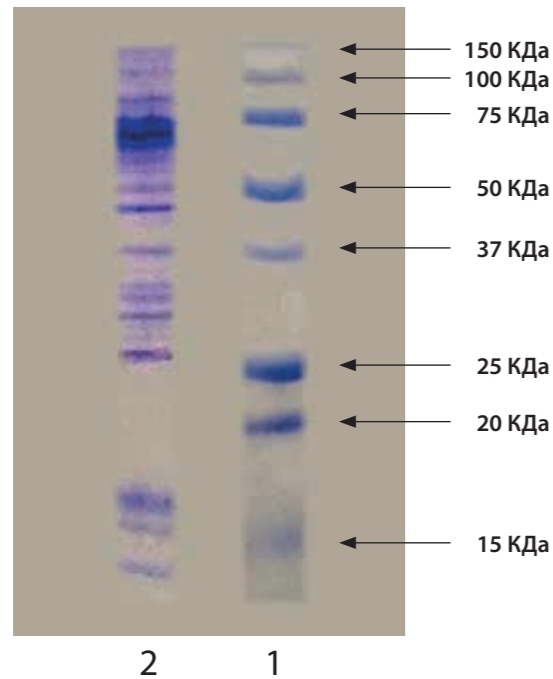


Рис. 1. Результаты электрофореза концентрированного препарата ALV-J/CLB-908U
1 — белковый маркер;
2 — препарат очищенного и концентрированного культурального ALV-J/CLB-908U.

образовавшихся комплексов использовали иммунопероксидазный конъюгат (Synbiotics, США) в рабочем разведении в буфере. Все компоненты в реакции добавляли в объеме 100 мкл, инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. В качестве субстрата использовали раствор АБТС (2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоная кислота), содержащий перекись водорода. Спустя 10 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 1% додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили с использованием спектрофотометра-ридера TECAN-Sunrise (TECAN, Австрия) при длине волны 405 нм. Анализ результатов осуществляли с использованием компьютерных программ «СИНКО-ИФА» (свидетельство о регистрации №2000611338) и Statistica 10.0 (Correlation matrices) (Stat Soft. Inc., США).

Определение чувствительности и специфичности тест-системы. Данный этап работы включал в себя исследование двух видов панелей сывороток. Первая включала в себя сыворотки крови кур в возрасте 120–330 суток, поступивших с птицефабрик РФ. Вторая состояла из сывороток крови экспериментально зараженных кур. Для получения данной панели использовали 2 группы цыплят-бройлеров в возрасте 40 суток. Одну из них в количестве 5 голов оставляли незараженной, другую заражали штаммом ALV-J/CLB-908U 4 пассажа, полученном на КК ФЭК. Заражающая доза вируса составляла 4,0 Ig ЭД₅₀/см³. Повторное заражение осуществляли спустя 28 суток. Отбор образцов сывороток крови проводили через 14 и 28 суток после 1 заражения и через 14, 21 и 28 суток после 2 заражения. Сыворотки исследовали методом ИФА с помощью тест-системы ФГБУ «ВНИИЗЖ» и коммерческого набора для выявления антител к вирусу лейкоза птиц фирмы IDEXX (США). Полученные результаты использовали для оценки специфичности и чувствительности разработанной тест-системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения антигена ALV проводили инактивацию, очистку и концентрирование вирусного материала. Концентрация полученного антигена ALV в ИФА составила 16000 пкг/см³. По результатам электрофореза очищенного концентрированного антигена в препарате выявлены специфические белки с молекулярными массами 85, 63, 48, 37, 30, 27 кДа (рис. 1).

Для определения оптимальной рабочей концентрации антигена готовили варианты разведений, которые использовали для сенсibilизации планшетов и тестирования с помощью положительной и отрицательной контрольных сывороток. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1
Определение оптимальной рабочей концентрации антигена для выявления антител к ALV
(n=3)

Образцы сывороток	Концентрация вирусного белка, пкг/см ³ / титр антител к ALV в ИФА*		
	80	32	16
Положительная контрольная сыворотка к ALV	3200±0	3200±0	800±0
Нормальная сыворотка крови кур (отрицательный контроль)	<100	<100	<100

* титр антител — величина, обратная разведению сыворотки.

Исходя из того, что при концентрации антигена 32 пкг/см³ значение титра антител гипериммунной сыворотки оставалось наибольшим, для проведения дальнейшей работы была выбрана указанная рабочая концентрация антигена.

Для определения формулы расчета титра антител к ALV при тестировании сывороток в одном разведении было исследовано в непрямом варианте ИФА 180 сывороток с разными титрами антител к вирусу ALV в разведениях 1:100, 1:200, 1:400. Титры испытуемых сывороток были предварительно установлены методом последовательных разведений. По результатам измерений для каждого разведения сывороток были вычислены значения S/P. На основе полученных данных с использованием программы Statistica 10.0 были построены линии регрессии, отражающие зависимость Ig титров антител, определенных методом последовательных разведений, от Ig S/P для каждого разведения сывороток. По результатам регрессионного анализа, наибольший коэффициент корреляции из трех, равных 0,96507; 0,94705 и 0,97583 соответственно для разведений 1:100, 1:200 и 1:400, был получен для разведения сывороток 1:400, которое было выбрано в качестве рабочего. Для данного разведения была построена линия регрессии (рис. 2), которая отражала зависимость между IgT ИФА, определенным методом последовательных разведений, и Ig S/P для разведения 1:400. Уравнение линейной регрессии имело вид: Ig T=3,2947+1,6932×Ig S/P

Для объективной оценки иммунного ответа необходимо было установить позитивно-негативный порог (ПНП). 183 сыворотки крови от 10-суточных цыплят, не имевших антител к ALV, а также кур 100–400-суточного возраста, показавших отрицательный результат с применением набора IDEXX (США), исследовали в трех повторностях в разные дни. В качестве положительного и отрицательного контроля были взяты стандартные контрольные сыворотки. ПНП определяли путем расчета средних значений S/P отрицательных сывороток для разведения 1:400 и стандартного отклонения. Среднее значение S/P отрицательных сывороток составило 0,1084, стандартное отклонение — 0,0894. На основании проведенного статистического анализа результат считали отрицательным, если величина T≤1:238, сомнительным — если 1:238<T<1:476 и положительным в случае T≥1:476. В случае, когда качественную сторону результатов реакции определяли по значению величины S/P: для отрицательного результата S/P≤0,3; для положительного результата S/P≥0,45; для сомнительного результата 0,3<(S/P)<0,45.

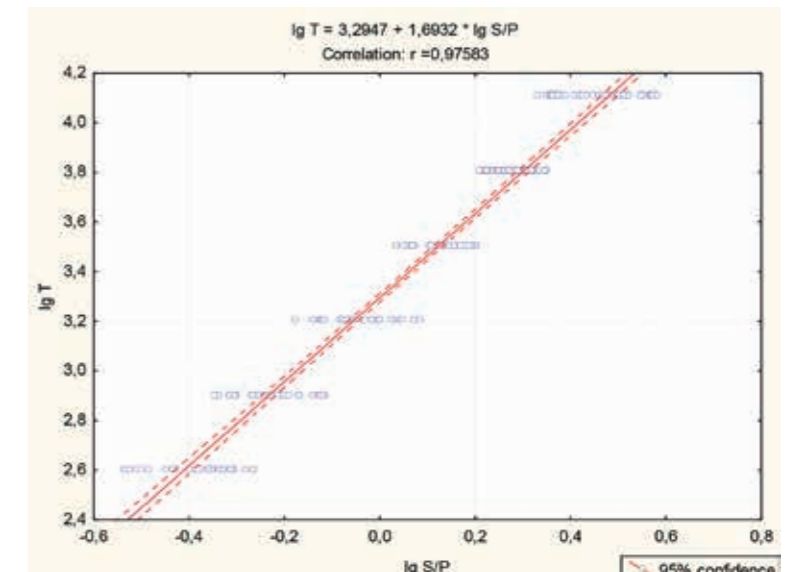


Рис. 2. График зависимости Ig титра, определенного методом последовательных разведений от Ig S/P, измеренного в одном разведении сыворотки 1:400

Уравнение регрессии будет верным при определенных значениях оптической плотности контрольных сывороток. Для расчета данного параметра были проанализированы по 59 значений оптической плотности положительной и отрицательной контрольных сывороток и разница между ними, исследованные в разведении 1:400. Были определены следующие показатели: среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал, минимальное и максимальное значение оптических плотностей контрольных сывороток (табл. 2).

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток должны быть следующие: для отрицательного контроля не выше 0,2; для положительного контроля не ниже 0,4; оптимальные значения оптической плотности положительного контроля — в диапазоне 0,5–0,6; минимальная разница оптической плотности положительного и отрицательного контролей не меньше 0,3.

Для определения воспроизводимости метода проводили тестирование 4 групп сывороток крови кур в трех повторностях на трех различных планшетах (табл. 3). В норме значение стандартного отклонения не должно превышать 1 log₂, а величина коэффициен-

Таблица 2
Результаты измерения оптической плотности отрицательного (NC_x) и положительного (PC_x) контроля

Показатели	NC _x	PC _x	PC _x - NC _x
Среднее	0,115	0,575	0,467
Станд. откл.	0,017	0,077	0,073
95% доверит. интервал	0,110–0,119	0,555–0,595	0,448–0,486
Минимум	0,09	0,399	0,285
Максимум	0,180	0,710	0,611

Таблица 3
Результаты теста на воспроизводимость

Группа сывороток	Показатель	Среднее значение по одному планшету			Среднее значение по трем планшетам
		1 планшет	2 планшет	3 планшет	
1	Титр антител в ИФА, log ₂	7,742	7,875	7,558	7,725
	Стандартное отклонение, log ₂	0,335	0,147	0,436	0,159
	CV, %	4,328	1,871	5,774	2,060
2	Титр антител в ИФА, log ₂	9,266	9,428	8,999	9,231
	Стандартное отклонение, log ₂	0,525	0,441	0,470	0,216
	CV, %	5,664	4,676	5,228	2,346
3	Титр антител в ИФА, log ₂	10,716	10,608	10,343	10,555
	Стандартное отклонение, log ₂	0,375	0,390	0,347	0,192
	CV, %	3,501	3,681	3,356	1,820
4	Титр антител в ИФА, log ₂	11,493	11,306	11,213	11,337
	Стандартное отклонение, log ₂	0,168	0,172	0,119	0,142
	CV, %	1,463	1,521	1,066	1,257

та вариации должна быть не более 10%. Полученные результаты показали, что среднее значение коэффициента вариации титра антител, определенное для каждой группы, не превышало 6%, а среднее значение стандартного отклонения было не выше 1 log₂.

Для оценки специфичности и чувствительности разработанной тест-системы применяли коммерческий набор для выявления антител к вирусу лейкоза птиц фирмы IDEXX (США). Специфичность метода определяли при тестировании сывороток от группы SPF-цыплят 3-недельного возраста. Все тест-системы показали при этом 100% специфичность. Результаты данного исследования приведены в табл. 4.

Для подтверждения специфичности разработанной методики были использованы также гетерологичные сыворотки к вирусам инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ), гриппа птиц (ГП), ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП), синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76), реовирусу (РЕО), микоплазмам птиц (Mg и Ms), метапневмовирусу птиц (МПВП), которые показали отрицательный результат при исследовании в ИФА с антигеном ALV.

Разработанная тест-система была протестирована в сравнении с коммерческим набором для выяв-

Таблица 4
Результаты исследования специфичности разработанной тест-системы с помощью коммерческого набора IDEXX

СПФ-цыплята 3-недельного возраста	ВНИИЗЖ	IDEXX
Положительные/исследованные	0/24	0/24
Среднее значение титра антител*	319	319
Минимум–максимум	22–382	0–669

* для тест-системы IDEXX образец считается положительным при значении титра, большем или равном 844.

Таблица 5
Результаты определения чувствительности и специфичности разработанного метода при исследовании сывороток крови кур с птицефабрик

ВНИИЗЖ	IDEXX		Всего
	положительные	отрицательные	
положительные	75	0	75
отрицательные	3	110	113
Всего	78	110	188

Таблица 6
Сравнение результатов исследования сывороток крови кур в ИФА с использованием коммерческого набора IDEXX и тест-системы «ВНИИЗЖ»

Иммунный статус	IDEXX			ВНИИЗЖ		
	полож.	отриц.	всего	полож.	отриц.	всего
Сыворотки от незараженных кур (возраст 40 суток)	2	14	16	2	14	16
Сыворотки крови кур через 14 суток после 1 заражения	4	10	14	4	10	14
Сыворотки крови кур через 28 суток после 1 заражения	9	1	10	9	1	10
Сыворотки крови кур через 14 суток после 2 заражения	9	1	10	10	0	10
Сыворотки крови кур через 21 сутки после 2 заражения	9	1	10	9	1	10
Сыворотки крови кур через 28 суток после 2 заражения	8	0	8	8	0	8
Сыворотки от незараженных кур (возраст 40 суток)	41	27	68	42	26	68

Таблица 7
Результаты определения чувствительности и специфичности разработанного метода при исследовании экспериментальных сывороток крови кур

ВНИИЗЖ	IDEXX		Всего
	положительные	отрицательные	
положительные	41	1	42
отрицательные	0	26	26
Всего	41	27	68

ления антител к вирусу лейкоза птиц фирмы IDEXX (США). Было параллельно протестировано 188 сывороток крови кур в возрасте 120–330 сут., поступивших с птицефабрик РФ. Результаты представлены в табл. 5. Относительная специфичность тест-системы по отношению к набору IDEXX составила 99,9%, чувствительность — 96%.

Был проведен эксперимент по заражению 40-суточных цыплят-бройлеров штаммом ALV-J/CLB-908U 4 пассажа (титр 4,0 lg ЭД₅₀/см³). Заражение проводили двукратно. Результаты исследования представлены в табл. 6 и 7.

Полученные результаты показали, что в 41 сыворотке крови были обнаружены антитела к ALV при исследовании коммерческим набором IDEXX и разработанной тест-системой. Из 27 негативных при исследовании набором IDEXX сывороток крови одна показала положительный результат в разработанной тест-системе. Исходя из результатов эксперимента, чувствительность тест-системы составила 99,9% а специфичность — 97%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система позволила получить воспроизводимые результаты, показала высокую чувствительность и специфичность в сравнении с коммерческим набором при тестировании проб сывороток крови кур из птицефабрик РФ и после экспериментального заражения штаммом ALV-J/CLB-908U.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лазарева С.П., Мудрак Н.С., Чвала И.А. Получение иммуноспецифических компонентов для диагностики лейкоза птиц подгруппы J // Инновационные процессы в АПК: сб. статей 6-й Междунар. научно-практ. конф. преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов. — Москва, 2014. — С. 156–159.
- Плотников В.А. Молекулярно-генетический анализ и биологическая характеристика полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории Российской Федерации: дис. ... канд. биол. наук. — Москва, 2014. — 146 с.
- Распространение вируса лейкоза птиц среди птицеводческих хозяйств Российской Федерации / Т.А. Тимофеева [и др.] // Матер. Междунар. юбилейной науч.-практ. конф. «Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве». — С.-Петербург, 2004. — С. 68–69.
- A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens / L.N. Payne [et al.] // J. Gen. Virol. — 1991. — Vol. 72. — P. 801–807.
- Fadly A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review // Avian Pathol. — 2000. — Vol. 29, № 6. — P. 529–535.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
- Payne L.N., Nair V. The long view: 40 years of avian leukosis research // Avian Pathol. — 2012. — Vol. 41, № 1. — P. 1–9.

DEVELOPMENT OF THE IMMUNOENZYME TEST SYSTEM FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST AVIAN LEUKOSIS VIRUS

S.P. Lazareva¹, M.A. Volkova², N.S. Mudrak³, I.A. Chvala⁴, T.V. Zhanova⁵

¹ Leading Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: lazareva@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mudrak@arriah.ru

⁴ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

⁵ Head of the Graduate School, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: zhanova@arriah.ru

SUMMARY

Test system based on the immunoenzyme method was developed for detection of antibodies to the avian leukosis virus (ALV) when testing sera in a single dilution. The antibody titer was determined basing on S/P ratio calculated for one working serum dilution (1:400). The developed test system demonstrated high specificity and sensitivity in comparison with the foreign commercial kit.

Key words: avian leukosis virus, ELISA, antigen, antibody.

INTRODUCTION

Avian leukosis is widely spread in commercial poultry production. Avian leukosis is caused by avian leukosis viruses belonging to *Retroviridae* family, *Alpharetrovirus* genus. ALV are divided in six antigenic groups: A, B, C, D, E, and J, which in their turn contain many strains. There are data proving possible cross neutralization of ALV-A and ALV-J capsid antigen p27, common for all groups [4]. Economic losses caused by ALV are usually associated with death from secondary infections and neoplastic diseases, as well as production decline including egg production and quality. ALV can cause different neoplastic diseases such as lymphadenosis myeloblastosis, myeloblastosis, glioma, osteopetrosis, haemangioma, etc. Chicken of more than 100 days of age demonstrate clinical signs of the disease [3, 5, 7].

The disease is diagnosed basing on the results of laboratory and pathomorphological tests. Antibodies to ALV are periodically detected in chicken serum samples from eggs and broiler farms of the Russian Federation [2]. The fact is indicative of the virus circulation in commercial poultry population. In the present time no registered vaccine against ALV exists. Due to this fact infection control is performed by means of establishing of the breeding stock with poultry originating from avian leukosis free farms. One of the ways to achieve this result is regular serological

monitoring of the poultry population followed by culling and destruction of diseased birds [7].

Commercial ELISA kits, Zoetis, IDEXX (USA), are used for serological diagnosis of ALV subgroups in the RF. No analogous test systems have been developed. So, development of domestic immunoenzyme test systems is a very important task.

MATERIALS AND METHODS

Virus. Strain ALV-J/CLB-908U, recovered in 2009 from pathological material obtained from poultry farm in Chelyabinsk Oblast [1]. The strain was deposited in the FGBI "ARRIAH" microorganism collection. 3rd passage virus-containing culture fluid, infectivity titre 5,5 Ig EID₅₀/cm³, was used. The virus was cultivated using initially trypsinized chicken embryo fibroblast cell culture.

Antigen. ALV antigen was prepared according to the previously developed method [1]. Commercial kit «Avian leukosis virus antigen test kit» (Synbiotics, USA) was used to determine the type-specific ALV antigen concentration in virus-containing materials according to the manufacturer's instruction.

Electrophoresis. Purified concentrated antigen was studied by means of electrophoresis using 12% polyacrylamide gel [6].

Positive and negative control sera. Hyperimmune serum were prepared according to the previously developed method [1]. Serum from ALV-free broilers was used as negative control.

Indirect ELISA. The antibody titre against ALV was determined by indirect ELISA. The plates (Nunc, MaxiSorp, Denmark) were coated with ALV antigen in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) for 18 hours at 4°C. Then 1% BSA was used for blocking for 1 hour at room temperature using TBR-T buffer containing water N-tris (hydroxymethyl) aminomethane (AppliChem, Germany), sodium chloride, twin20 (ICN Biomedicals, USA). Dilution buffer was used for

dilution of tested and control samples (Synbiotics, USA). TBR-T buffer solution was used for inter-stage washing. Tested and control sera were tested at 1:400 dilution. Immunoperoxidase conjugate (Synbiotics, USA) was used at working dilution for detection of complexes in the dilution buffer. All components were added at the amount of 100 µl and incubated for 30 minutes at 37°C. 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] solution containing hydrogen peroxide was used as a substrate. In 10 minutes the reaction was stopped by adding 1% sodium dodecyl sulphate solution into each cell. The reaction was recorded using spectrophotometer TECAN-Sunrise (TECAN, Austria) at 405 nm wave length. The result analysis was performed using "SINKO-IFA" software (accreditation certificate 2000611338) and Statistica 10.0 (Correlation matrices) (Stat Soft. Inc., USA).

Determination of the test system sensitivity and specificity. At this stage two types of serum panels were tested. The first contained blood serum from chicken at 120-330 days of age from the RF poultry farms. The second one contained sera from experimentally infected chicken. Two groups of 40-day-old chickens were used for this panel preparation. One group of 5 birds was not infected and the other one was inoculated with 4th passage ALV-J/CLB-908U strain cultured in chicken embryo fibroblast cell culture. The virus infecting dose was 4.0 Ig EID₅₀/cm³. In 28 days the chickens were reinfected. Blood serum samples were collected in 14 and 28 days after the first infection and in 14, 21 and 28 days after the second infection. Sera were tested with ELISA using the FGBI "ARRIAH" test system and the commercial kit for detection of antibodies against ALV, IDEXX (USA). The obtained results were used to assess specificity and sensitivity of the developed test system.

RESULTS AND DISCUSSION

Inactivation, purification and concentration of the virus material were performed for ALV preparation. Concentra-

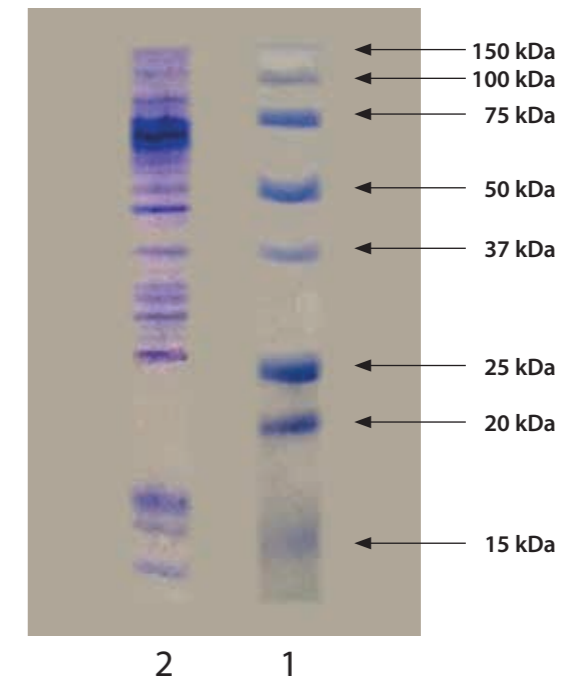


Figure 1. Results of concentrated ALV-J/CLB-908U electrophoresis
1 – protein marker;
2 – purified and concentrated culture ALV-J/CLB-908U.

tion of the prepared ALV antigen was 16000 pg/cm³. Specific antibodies with molecular weight of 85, 63, 48, 37, 30, 27 kDa were detected by electrophoresis of the purified concentrated antigen (fig. 1).

Different dilutions were prepared for detection of optimal working antigen concentration. They were used for coating plates and tests using positive and negative control sera. The data are shown in the table 1.

Basing on the fact that at antibody titre of the hyperimmune serum remained highest the antigen concentration

Table 1
Determination of the optimal working antigen concentration for detection of antibodies against ALV (n=3)

Serum samples	Virus protein concentration, pg/cm ³ / titre of antibodies against ALV using ELISA*		
	80	32	16
Positive control serum to ALV	3200±0	3200±0	800±0
Normal chicken blood serum (negative control)	<100	<100	<100

* antibody titre – reciprocal value of the serum dilution

Table 2
Measuring Optical Density in Negative (NC_x) and Positive Controls (PC_x)

Values	NC _x	PC _x	PC _x - NC _x
Mean	0.115	0.575	0.467
Standard deviation	0.017	0.077	0.073
95% confidence range	0.110–0.119	0.555–0.595	0.448–0.486
Minimum	0.09	0.399	0.285
Maximum	0.180	0.710	0.611

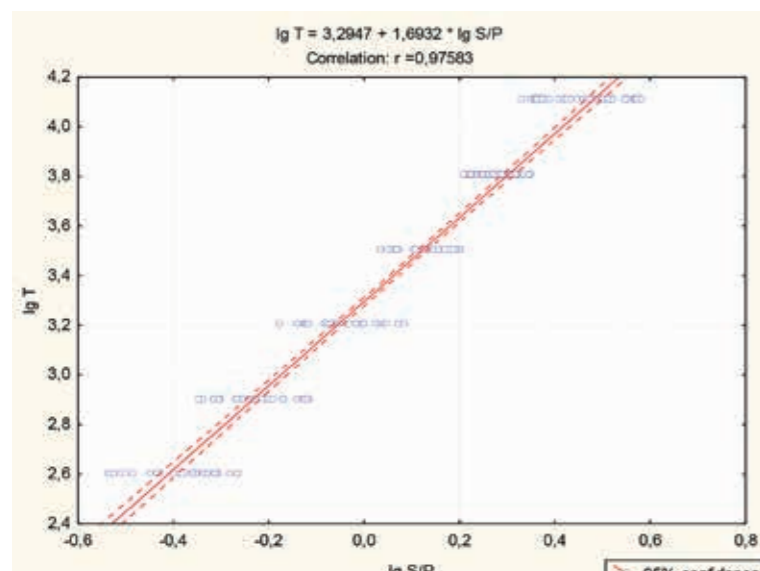


Fig. 2. Dependence between Ig titre determined by serial dilution assay and Ig S/P measured in one serum dilution 1:400

Based on the regression analysis the highest correlation coefficient out of the three 0.96507, 0.94705 and 0.97583 (corresponding to 1:100, 1:200 and 1:400 dilutions) was obtained for sera dilution 1:400 and this dilution was chosen as the working one. A regression line was plotted for this dilution (Fig. 2) to depict the dependence between ELISA IgT, determined by serial dilution assay, and S/P Ig for 1:400 dilution.

Here is the equation of linear regression:

$$\lg T = 3.2947 + 1.6932 \times \lg S/P$$

In order to objectively assess immune response it is required to set a positive-negative threshold (PNT). 183 sera samples from 10-day-old chicks having no antibodies to ALV and from 100-400-day-old chicks demonstrating negative results in IDEXX (USA) kit were tested in triplicate on different days. Reference control sera were taken as positive and negative control. PNT was identified by calculating mean values of S/P negative sera for dilution 1:400 and standard deviation. Mean value of S/P negative sera was 0.1084, standard deviation – 0.0894. Based on statistical analysis the result was considered negative, if $T \leq 1:238$, dubious if $1:238 < T < 1:476$ and positive if $T \geq 1:476$. When quality of the test results was determined by S/P value: negative $S/P \geq 0.3$; positive $S/P \geq 0.45$; dubious results $0.3 < (S/P) < 0.45$.

The regression equation will be correct at the set values of optical density in the control sera. In order to calculate this parameter we analyzed 59 values of optical density in positive and negative control sera and difference between them, tested in dilution 1:400. The following parameters were calculated: mean value, standard deviation, confidence interval, minimum and maximum optical density of control sera (Table 2).

Based on Table 2, the admissible values of optical density in control sera shall be: for negative control not higher than 0.2; for positive control not less than 0.4; optimal value of optical density in positive control shall range between 0.5-0.6; minimum difference between optical density of positive and negative controls - not less than 0.3.

of 32 pg/cm³ the specified working antigen concentration was chosen for further operations.

To determine the formula for calculating the titer of antibodies against ALV during serum tests at a single dilution 180 sera with different titres of antibodies against ALV in 1:100, 1:200, 1:400 dilutions were tested using indirect ELISA. Tested serum titres were previously determined using serial dilution method. S/P values were calculated for each serum dilution basing on the measurement results. Regression lines were plotted on the basis of obtained data using Statistica 10.0 software. They reflect the dependence of antibody Ig titres determined by the serial dilution method on Ig S/P for each serum dilution.

Table 3
Reproducibility Test Results

Sera group	Criterion	Mean value for one plate			Mean value for three plates
		1 plate	2 plate	3 plate	
1	ELISA antibody titre, log ₂	7.742	7.875	7.558	7.725
	Standard deviation, log ₂	0.335	0.147	0.436	0.159
	CV, %	4.328	1.871	5.774	2.060
2	ELISA antibody titre, log ₂	9.266	9.428	8.999	9.231
	Standard deviation, log ₂	0.525	0.441	0.470	0.216
	CV, %	5.664	4.676	5.228	2.346
3	ELISA antibody titre, log ₂	10.716	10.608	10.343	10.555
	Standard deviation, log ₂	0.375	0.390	0.347	0.192
	CV, %	3.501	3.681	3.356	1.820
4	ELISA antibody titre, log ₂	11.493	11.306	11.213	11.337
	Standard deviation, log ₂	0.168	0.172	0.119	0.142
	CV, %	1.463	1.521	1.066	1.257

Table 4
Results of Specificity Test for the Developed Test System Using Commercial IDEXX Kit

SPF 3-week-old chicks	ARRIAH	IDEXX
Positive/tested	0/24	0/24
Mean antibody titre *	319	319
Minimum-maximum	22-382	0-669

*for IDEXX test-system sample is considered positive, if titre is ≥ 844 .

In order to determine test reproducibility we tested 4 groups of sera from chickens in triplicate on three different plates (Table 3). Normal standard deviation shall not exceed 1 log₂ and variation coefficient shall not be more than 10%. The obtained results demonstrated that mean variation coefficient of antibody titre determined for each group did not exceed 6% and the mean standard deviation did not exceed 1 log₂.

In order to assess specificity and sensitivity of the developed test system we used IDEXX commercial kit (USA) for detection of antibodies to avian leucosis. Specificity was determined when we tested sera from SPF 3-week-old chickens. All the tests systems demonstrated 100% specificity. Corresponding test results are given in Table 4.

In order to confirm specificity of the developed method we used heterologous sera to the viruses of the following diseases: infectious bronchitis (IBV), infectious bursal disease (IBD), infectious laryngotracheitis (IL), avian influenza (AI), Newcastle disease (ND), infectious avian encephalomyelitis (IAE), egg drop syndrome (EDS-76),

reovirus, avian mycoplasma (Mg and Ms), avian metapneumovirus (aMPV) and they gave negative results in ELISA with ALV antigen.

The developed test-system was tested in comparison with IDEXX (USA) commercial kit for detection of antibodies to avian leucosis virus. We simultaneously tested 188 sera from 120-330-day-old chicks from Russian poultry establishments. Corresponding results are given in Table 5. Relative specificity of the test-system in comparison with IDEXX kit was 99.9% and sensitivity -96%.

We experimentally infected 40-day-old broilers with ALV-J/CLB-908U strain of the 4th passage (titre 4.0 Ig EID₅₀/cm³). The broiler chicks were inoculated twice. Research results are given in Table 6 and 7.

The obtained results revealed antibodies to ALV in 41 sera samples when tested in IDEXX commercial kit and the developed test system. One serum out of 27 negative sera samples tested in IDEXX turned out to be positive in the developed test system. Based on the experiment results sensitivity of the test system was 99.9%, and specificity – 97%.

Table 5
Results of Sensitivity and Specificity Tests for the Developed Method Used for Chicken Sera from Poultry Establishments

ARRIAH	IDEXX		Total
	Positive	Negative	
Positive	75	0	75
Negative	3	110	113
Total	78	110	188

Table 6
Comparison of test results obtained for chicken sera in indirect ELISA using IDEXX commercial kits and ARRIAH test system

Immune status	«IDEXX»			ARRIAH		
	positive	neg	total	positive	neg	total
Sera from non-infected chickens (40-day-old chicks)	2	14	16	2	14	16
Sera samples from chickens on day 14 post 1 st infection	4	10	14	4	10	14
Sera samples from chickens on day 28 post 1 st infection	9	1	10	9	1	10
Sera samples from chickens on day 14 post 2 nd infection	9	1	10	10	0	10
Sera samples from chickens on day 21 post 2 nd infection	9	1	10	9	1	10
Sera samples from chickens on day 28 post 2 nd infection	8	0	8	8	0	8
Sera samples from non-infected chickens (40-day-old chicks)	41	27	68	42	26	68

Table 7
Results of Sensitivity and Specificity Tests for the Developed Method Used for Experimental Chicken Sera

ARRIAH	IDEXX		Total
	Positive	Negative	
Positive	41	1	42
Negative	0	26	26
Total	41	27	68

CONCLUSION

The developed test system made it possible to get reproducible results, demonstrated high sensitivity and specificity in comparison with the commercial kit both when testing chicken sera from the RF poultry establishments and after experimental infection with ALV-J/CLB-908U strain.

REFERENCES

1. Lazareva S.P., Mudrak N.S., Chvala I.A. Development of immunospecific components for diagnosis of subgroup J avian leucosis // Innovations in Agro-industrial complex: Collection of Papers of the 6th International Research Conference of Teachers, Young Scientists, Post-Graduate Students and Students. – Moscow, 2014. – P. 156–159.
2. Plotnikov V.A. Molecular and genetic analysis and biological characteristics of avian leucosis virus field isolates circulating in the Russian Federation: PhD thesis, Candidate of Science (Biology). – Moscow, 2014, -146 p.

3. Spread of ALV on poultry farms of the Russian Federation/ T.A. Timofeyeva [et al.] // Proceedings of the International Jubilee Scientific Conference "New Trends in Epizootology, Diagnosis and Prevention of Infectious and Non-Infectious Avian Diseases in Poultry Industry" – St. Petersburg, 2004, P. 68–69.
4. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens / L.N. Payne [et al.] // J. Gen. Virol. – 1991. – Vol. 72. – P. 801–807.
5. Fadly A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29, № 6. – P. 529–535.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
7. Payne L.N., Nair V. The long view: 40 years of avian leukosis research // Avian Pathol. – 2012. – Vol. 41, № 1. – P. 1–9.



ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ

Вакцину для профилактики болезни Марека «Маривак 1+3»

В результате проведенных научно-исследовательских работ было оптимально подобрано и обосновано соотношение штаммов в препарате. Изучены и доказаны иммунологические и протективные свойства вакцины, обусловленные синергическим действием вирусов, безопасность для окружающей среды и человека.

Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является отечественным аналогом зарубежных вакцин против болезни Марека из 1 и 3 серотипов вируса, содержащим новую комбинацию известных штаммов.

На сегодняшний день проведен полный комплекс доклинических исследований и клинических испытаний вакцины «Маривак 1+3». На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является безвредным препаратом, обладает высокой иммуногенной активностью против высоковирулентных (vv) и высоковирулентных плюс (vv+) штаммов вируса БМ и может успешно использоваться в ветеринарной практике для специфической профилактики БМ.

пользоваться в ветеринарной практике для специфической профилактики БМ. Однократная вакцинация способствует формированию напряженного иммунитета, который сохраняется на протяжении всей жизни привитой птицы и предохраняет от болезни Марека. Вакцина стабильна на протяжении 24 месяцев при соблюдении требований к хранению. Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» зарегистрирована и разрешена к применению в Российской Федерации.

Справка

Болезнь Марека (БМ) — высококонтагиозное, лимфопролиферативное, злокачественное вирусное заболевание птиц. БМ характеризуется образованием единичных и множественных опухолей во внутренних органах, коже, мышцах, а также изменениями центральной и периферической нервной системы. Вирус болезни Марека (ВБМ) повреждает иммунокомпетентные органы (селезенку, тимус, клоакальную сумку) и обладает, таким образом, иммунодепрессивной активностью, что приводит к снижению общей резистентности птиц и повышению их чувствительности к другим болезням. Важным средством предупреждения БМ и снижения потерь от заболевания является вакцинопрофилактика. Для специфической профилактики используют вакцины трех типов: из аттенуированных штаммов ВБМ (серотип 1), из природноослабленного непатогенного ВБМ (серотип 2) и штаммов вируса герпеса индеек (серотип 3).

УДК 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА И ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ИЗОЛЯТОМ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ ПОДТИПА В

М.А. Волкова¹, П.С. Ярославцева², В.Ю. Сосипаторова³, Т.И. Ерошина⁴, И.А. Чвала⁵

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

² младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yarovslavtseva@arriah.ru

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

⁴ ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

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

РЕЗЮМЕ

Экспериментальное заражение 7-суточных цыплят-бройлеров изолятом метапневмовируса птиц подтипа В вызывало развитие слабо выраженных признаков поражения респираторной системы и опухание инфраорбитальных синусов через 5–15 суток после инфицирования. Наблюдалось изменение в тканях трахеи, носовых ходов и первичных лимфоидных органов. Наличие генома метапневмовируса птиц установлено методом ОТ-ПЦР-РВ в органах верхнего отдела респираторного тракта, инфраорбитальных синусах и гардировой железе в период 2–12 суток после заражения.

Иммунный ответ характеризовался образованием гуморальных и локальных антител через 7–21 сутки после инфицирования. Через 3 суток после заражения регистрировали увеличение процента CD8a+ T-клеточной субпопуляции в крови и селезенке инфицированных цыплят.

Ключевые слова: метапневмовирус птиц, клеточный и гуморальный иммунитет, патогенез.

UDC 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

STUDIES OF PATHOGENESIS AND IMMUNE RESPONSE AT EXPERIMENTAL INFECTION OF BROILER CHICKS WITH AVIAN METAPNEUMOVIRUS SUBTYPE B

M.A. Volkova¹, P.S. Yaroslavtseva², V.Yu. Sosipatorova³, T.I. Eroshina⁴, I.A. Chvala⁵

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

² Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yarovslavtseva@arriah.ru

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

⁴ Leading Technologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

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

SUMMARY

Experimental infection of 7-day-old chicks with the isolate of avian metapneumovirus Subtype B induced mild signs of respiratory infection and swelled infraorbital sinuses in 5–15 days post infection. Lesions in tissues of trachea, nasal passages and primary lymphoid organs were reported. Using real-time RT-PCR avian metapneumovirus genome was detected in the upper part of the respiratory tract, infraorbital sinuses and Harderian gland within 2–12 days post infection.

The immune response was characterized by formation of humoral and local antibodies in 7–21 days post infection. In 3 days post infection increased percentage of CD8a+ T-cell subpopulation was reported in blood and spleen of the infected chicks.

Key words: avian metapneumovirus, cell-mediated and antibody-mediated immunity, pathogenesis.

ВВЕДЕНИЕ

Метапневмовирус птиц (МПВ) — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*, род *Metapneumovirus*, вид *Avian Metapneumovirus*. Впервые был выявлен в 1978 г. в Южной Африке.

МПВ птиц является возбудителем высококонтагиозного респираторного заболевания индеек, кур и других видов птиц [2, 4]. Заболевание характеризуется воспалительными процессами верхних дыхательных путей у индеек, у цыплят-бройлеров может вызывать синдром опухшей головы, у кур-несушек преимущественно приводит к снижению яичной продуктивности [10, 14]. На основании антигенных и генетических (по нуклеотидному составу гена белка прикрепления G) различий выделяют 4 подтипа вируса: А, В, С и D [8, 12]. Вирусы подтипов А и В были выявлены в Африке, Азии, Южной и Северной Америке, Европе, России. Подтип С был выделен от индеек с респираторными признаками болезни в США в 1996 г., а подтип D — во Франции и Корее [1–3, 6, 7, 9–11, 13].

МПВ птиц репродуцируется в тканях верхнего отдела респираторного тракта птиц (носовых полостей, гортани, трахеи) и конъюнктивы в течение 7–10 суток после инфицирования [2, 4]. Регистрировали случаи выявления вируса в легких и яйцеводах. Период клинического проявления болезни обычно не превышает 7–12 суток. Поскольку МПВ птиц вызывает в основном локальную инфекцию, ограниченную пределами респираторного тракта, решающую роль при МПВ-инфекции играет местный и клеточный иммунный ответ [5, 9, 13, 14].

Гуморальный иммунный ответ является более важным для взрослых птиц, МПВ птиц способен вызвать иммуносупрессию, увеличивающую предрасположенность птиц к вторичным инфекциям, и может снижать эффективность вакцинации против других заболеваний [9, 14].

В настоящее время в большей степени изучены и представлены в научной литературе патогенез и иммунный ответ индеек, инфицированных МПВ птиц, а патогенез и иммунный ответ цыплят после заражения изолятами МПВ птиц, выделенными от кур, еще недостаточно исследованы.

В связи с этим целью работы являлось изучение патогенеза и иммунного ответа при экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятом МПВ птиц подтипа В.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Для заражения использовали изолят МПВ птиц подтипа В (aMPV/B/22/2010), полученный из патологического материала от цыплят-бройлеров одной из птицефабрик Белгородской области РФ, в виде культуральной суспензии 8 пассажа на первично трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК).

Эксперимент на цыплятах. 7-суточные цыплята-бройлеры, не имеющие антител к МПВ птиц, были разделены на две группы по 30 голов в каждой. Опытной группе вводили культуральную жидкость, содержащую МПВ птиц подтипа В, интраназально и закапыванием на конъюнктиву глаза в дозе 6,1 Ig ТЦД₅₀/0,4 мл на цыпленка. Обе группы цыплят содержались отдельно в изолирующих боксах. На 2, 5, 8, 12, 15, 20 суток после инфицирования отбирали ротоглоточные смывы

и проводили убой 4 цыплят из опытной группы и 4 неинфицированных цыплят для патологоанатомического исследования и отбора проб биоматериала (кровь, Гардерева железа, решетчатая кость, синус, трахея, легкое, селезенка, тимус). До заражения и через 7, 14 и 21 сутки после него проводили отбор проб крови, слезной жидкости и ротоглоточных смывов у опытных и контрольных цыплят для выявления специфических к МПВ птиц антител методом иммуноферментного анализа (ИФА).

ИФА. Выявление антител к МПВ птиц проводили с использованием набора для определения антител к МПВ птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении согласно инструкции производителя (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Результат реакции считали положительным при величине титра антител 392 и выше (за титр антител принимали величину, обратную разведению сыворотки).

Определение титра антител к МПВ птиц в слезной жидкости и трахеальных смывах цыплят проводили в непрямом варианте ИФА с использованием планшетов (Nunc, MaxiSorp, Дания), сенсibiliзированных антигеном МПВ птиц в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5), по стандартному протоколу. Учет реакции проводили на спектрофотометре-ридере Sunrise Basic (Tecan, Австрия) при длине волны 405 нм с использованием компьютерной программы «СИНКО-ИФА». Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

ОТ-ПЦР-РВ проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с использованием ферментов AMV Reverse Transcriptase и Go Taq⁺ Flexi DNA Polymerase (Promega, США), праймеров и ДНК-зонда для выявления МПВ птиц подтипа В.

Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов. Выделение лимфоцитов из периферической крови и лимфоидных органов кур проводили по стандартной методике с использованием Ficoll-Paque[™] PLUS (Amersham Biosciences, Швеция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD45-FITC, CD4-PE, CD8α-PE, CD3-PE (Southern Biotech, США). Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

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 для обзорной окраски. 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). Существенность различий результатов цитофлуориметрических исследований проб от цыплят из инфицированной и контрольной групп определяли с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У экспериментально зараженных цыплят наблюдалось угнетенное состояние, носовые истечения и одностороннее либо двустороннее опухание инфраорбитальных синусов в период с 5 по 15 сутки после заражения.

При патологоанатомическом вскрытии наблюдали точечные кровоизлияния в трахее (8, 12 и 15 сутки), отечность инфраорбитальных синусов (8, 12 и 15 сутки), кровенаполненность легких (15 сутки), изменение окраски тимуса (12 и 15 сутки после заражения).

При гистологическом исследовании носовых ходов были выявлены частичное разрушение слизистого слоя, утолщение подслизистого слоя с очагами геморрагий и редукция железистых клеток экспериментально зараженных птиц (рис. 1).

В трахее зараженных птиц наблюдали частичную десквамацию реснитчатого эпителия и умеренное утолщение подслизистого слоя за счет инфильтрации лимфоцитов (рис. 2). При гистологическом исследовании тимуса в мозговом слое наблюдали разрастание ретикулярной структуры с тельцами Гассала и уменьшение количества миоидных клеток (рис. 3).

При исследовании методом ОТ-ПЦР-РВ геном МПВ птиц подтипа В был обнаружен в ротоглоточных смывах зараженных цыплят в период со 2 по 8 сутки после заражения (табл. 1); в трахее, тканях носовых полостей, инфраорбитальных синусах и гардерева железа — на 5, 2–12, 5–8 и 5 сутки соответственно.

В течение эксперимента в пробах легких геном МПВ птиц не выявили.

У контрольных цыплят клинических признаков, макро- и микроизменений в органах и тканях не выявили. При исследовании проб органов от контрольной птицы в ПЦР получены отрицательные результаты.

При исследовании сывороток крови в ИФА специфические антитела к МПВ птиц выявляли, начиная с 7 суток после заражения, при этом средний титр антител по группе увеличился с 576 до 1732, а средний титр положительных проб — с 758 до 2832 (табл. 2). Антитела были выявлены у 7, 5 и 6 цыплят из опытной группы, соответственно на 7, 14 и 21 сутки. У цыплят неинфицированной группы специфические антитела в крови не обнаружили.

Полученные данные об увеличении выработки гуморальных антител при МПВ-инфекции согласуются с ре-

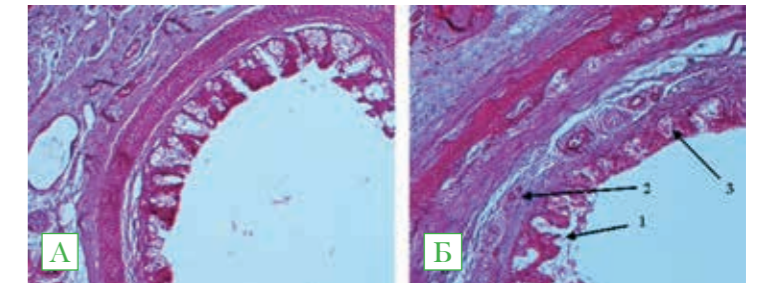


Рис. 1. Решетчатая кость цыпленка через 12 суток после начала эксперимента (окраска гематоксилин-эозин, об. 10, ок. 10)

А — контрольная группа; Б — опытная группа; 1 — слизистый слой, 2 — подслизистый слой с очагами геморрагий, 3 — железистые клетки.

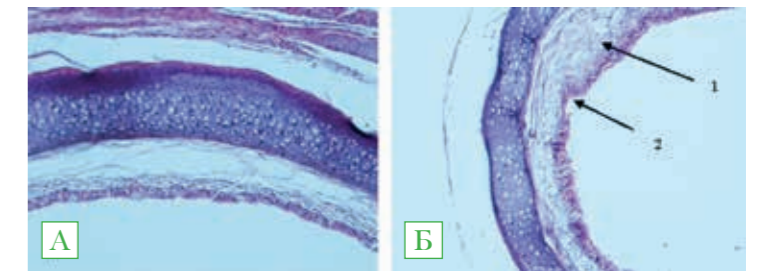


Рис. 2. Трахея цыпленка через 12 суток после начала эксперимента (окраска гематоксилин-эозин, об. 15, ок. 10)

А — контрольная группа; Б — опытная группа; 1 — реснитчатый эпителий, 2 — подслизистый слой.

зультатами Rautenschlein S. и соавт., которые с 10 суток после окулоназального заражения 16-суточных цыплят-бройлеров двумя вирулентными изолятами подтипов А и В регистрировали выработку специфических антител в ИФА с пиком в 24–28 суток после заражения [14].

Местный антительный ответ обнаруживали у меньшего количества инфицированных цыплят из группы. Специфические антитела класса А (IgA) были обнаружены в ротоглоточных смывах зараженных цыплят через 7 и 14 суток после инфицирования, антитела класса М (IgM) и G (IgG) — через 7–21 сутки (рис. 4). Пик образо-

Таблица 1
Результаты выявления генома МПВ птиц подтипа В методом ОТ-ПЦР-РВ в ротоглоточных смывах и органах респираторного тракта зараженных цыплят

Проба	Период после заражения, сутки				
	2	5	8	12	15
Ротоглоточные смывы	2/10*	8/10	8/10	0/10	0/10
Трахея	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3
Ткани носовых полостей	2/3	3/3	3/3	1/3	0/3
Легкие	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Синус	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3
Гардерева железа	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3

* количество проб, в которых выявлен геном МПВ птиц/общее количество проб.

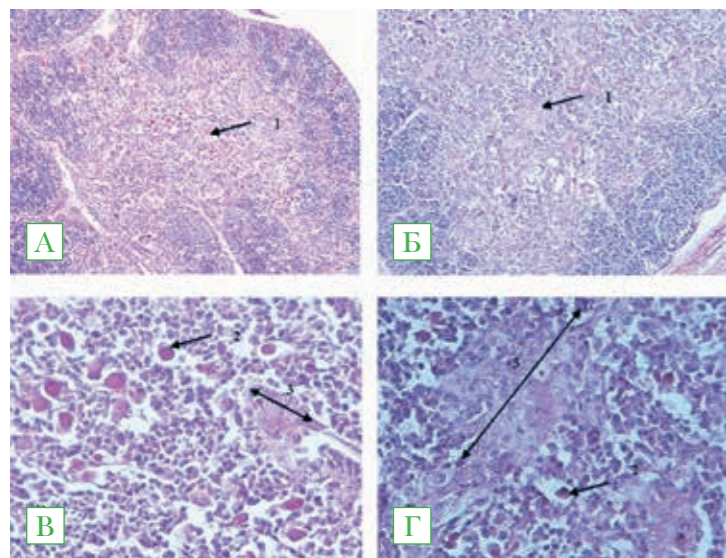


Рис. 3. Тимус цыпленка через 12 суток после начала эксперимента (окраска гематоксилин-эозин)

A — контрольная группа, об. 10, ок. 10; Б — опытная группа, об. 10 ок. 10; В — контрольная группа, об. 40, ок. 10; Г — опытная группа, об. 40, ок. 10; 1 — тельца Гассалья, 2 — миоидные клетки, 3 — ретикулярная структура.

В течение 2–15 суток после заражения определили снижение количества CD4+ Т-лимфоцитов (в среднем по группе) в крови инфицированных цыплят в 1,6 раза, а контрольных цыплят — в 1,2 раза. Через 20 суток после заражения средний уровень CD4+ в крови цыплят обеих групп существенно не отличался. Количество цитотоксических клеток (CD8α+) в крови инфицированных цыплят (в среднем по группе) через 2, 8, 15 и 20 суток после заражения было больше, чем у контрольных птиц, в 1,8–1,5 раза. В селезенке инфицированных цыплят наблюдали более низкий уровень Т-хелперов через 8–12 суток после заражения по сравнению с контрольными цыплятами (в среднем в 1,5–1,4 раза), сопровождающийся увеличением относительного количества цитотоксических лимфоцитов (в 1,2–1,3 раза больше, чем у контрольных цыплят).

При исследовании иммунного фенотипа клеток тимуса регистрировали общую динамику к снижению относительного количества CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в обеих группах через 8 суток после заражения и увеличение к концу опыта.

Таким образом, клеточный иммунный ответ у цыплят после заражения МПВ птиц характеризовался существенным увеличением уровня цитотоксических лимфоцитов в крови и селезенке. Усиление функциональной активности Т-лимфоцитов при МПВ-инфекции было также показано в работах других авторов [9, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальном заражении изолят МПВ птиц подтипа В вызывал у цыплят-бройлеров респираторное заболевание с характерными для данной инфекции клиническими и патологическими изменениями на 5–15 сутки после инфицирования. Геном МПВ птиц подтипа В был обнаружен методом ОТ-ПЦР-РВ в ротоглоточных смывах и органах (трахея, ткани носовых полостей, инфраорбитальный синус, гардерева железа) инфицированных птиц со 2 по 12 сутки после заражения.

У зараженных цыплят отмечали увеличение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови и селезенке. Специфические антитела к МПВ птиц обнаружены в крови 50–70% инфицированных цыплят, начиная с 7 суток после заражения. Местный иммунный ответ характеризовался выработкой антител трех классов А, М и G в ротоглоточных смывах (у 20–50% цыплят) и слезной жидкости (у 10–50% цыплят) с 7 по 21 сутки после заражения.

вания IgM и IgA регистрировали через 7 суток, а IgG через 14 суток после инфицирования.

В слезной жидкости зараженных цыплят были выявлены преимущественно антитела класса IgM через 7–21 сутки после заражения. IgG выявляли в более низких титрах также через 7–21 сутки после заражения, а IgA был обнаружен только у одного цыпленка через 14 суток после инфицирования (рис. 4). Меньшая длительность и интенсивность местного иммунного ответа, по сравнению с гуморальным ответом при экспериментальном заражении цыплят-бройлеров МПВ птиц, была отмечена также другими авторами, которые связывали это с возможностью многократного инфицирования птиц МПВ в течение периода выращивания [14]. У цыплят контрольной группы специфические антитела к МПВ птиц в ротоглоточных смывах и слезной жидкости не обнаруживали.

Была проведена оценка клеточного иммунного ответа цыплят после заражения (рис. 5).

Таблица 2
Результаты выявления антител к МПВ птиц в ИФА

Группа	Период после заражения, сутки			
	0	7	14	21
Контроль	266±56 ^а 0/6 ^б	281±52 0/6	199±50 0/6	190±49 0/6
Опыт		576±174 758±215 ^а 7/10	1195±604 2288±1022 5/10	1732±861 2832±1272 6/10

^а средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

^б средний положительный титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

^с отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Выявление и типирование метапневмовирусов птиц в Российской Федерации / З.Б. Хлебовец, А.С. Пронин, И.А. Борисова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — 2007. — Т. 5. — С. 317–324.
2. Лазуткина Е.А., Бессарабов Б.Ф. Клинические признаки, патологоанатомические и гистоморфологические изменения при синдроме опухшей головы у цыплят-бройлеров // Материалы III междунар. вет. конгр. по птицеводству. — М., 2007. — С. 111–116.
3. Никонова З.Б. Филогенетический анализ изолятов метапневмовирусов птиц, выявленных в России и странах ближнего зарубежья в 2005–2011 гг. / З.Б. Никонова, Н.Г. Зиняков, Н.А. Перевозчикова // Ветеринария и кормление. — 2012. — № 5. — С. 34–36.
4. Cook J.K.A. Avian rhinotracheitis // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2000. — Vol. 19 (2). — P. 602–613.
5. Effects of cyclosporine A induced T-lymphocyte depletion on the course of avian metapneumovirus (aMPV)

infection in turkeys / D. Rubbenstroth, T.S. Dalgaard, S. Kothlow [et al.] // Dev. Comp. Immunol. — 2010. — Vol. 34. — P. 518–529.

6. Ganapathy K. Avian metapneumovirus – an elusive pathogen of chickens (Part 1) // World Poultry. — 2007. — Vol. 23. — P. 36–37.

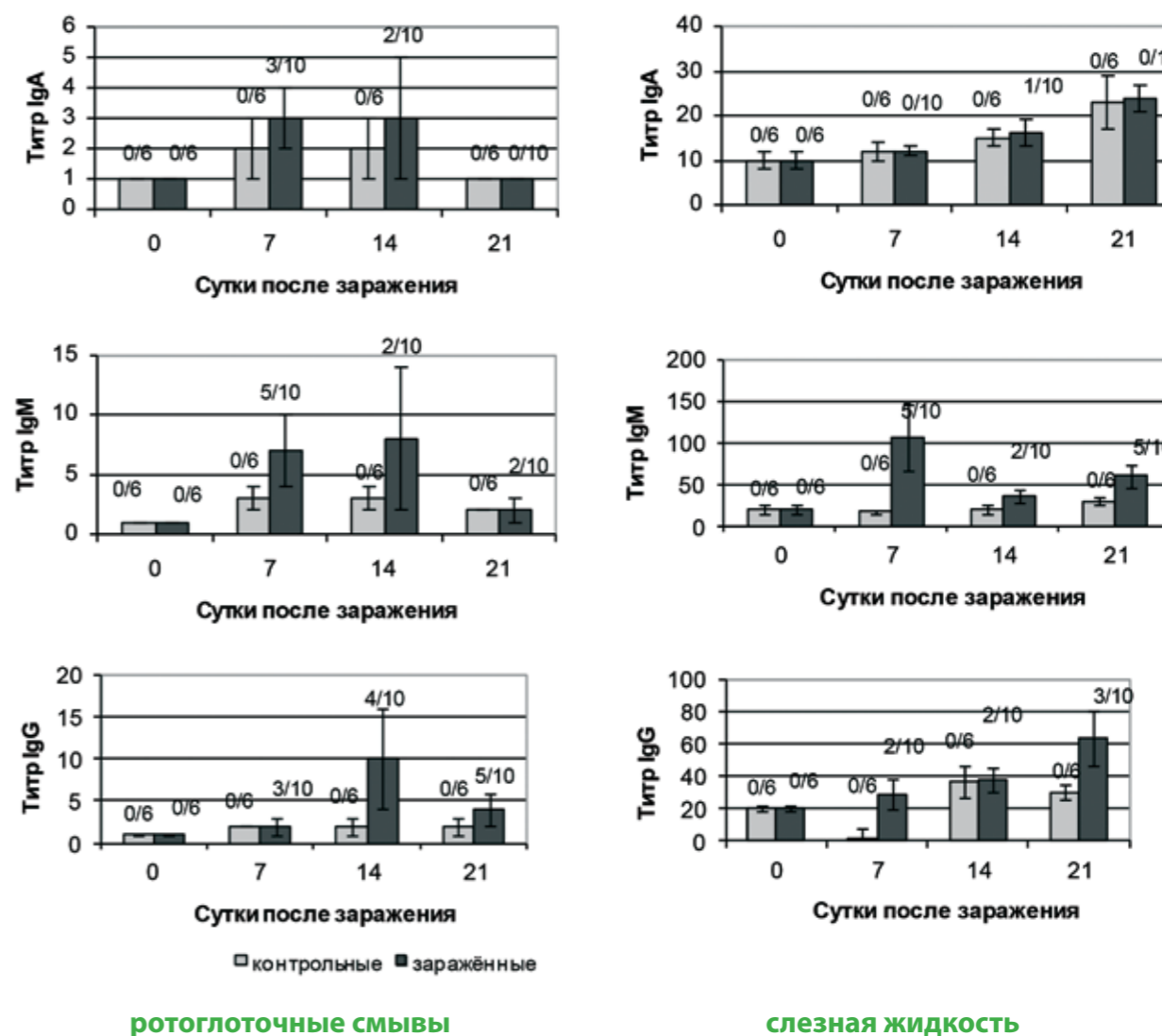
7. Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea / J. Kwon, H. Lee, S. Jeong [et al.] // J. Vet. Sci. — 2010. — Vol. 11. — P. 59–66.

8. Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus / O. Guionie, D. Toquin, E. Sellal [et al.] // J. Virol. Methods. — 2007. — Vol. 139. — P. 150–158.

9. Liman M., Rautenschlein S. Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2007. — Vol. 115. — P. 273–285.

Рис. 4. Результаты выявления антител к МПВ птиц в ротоглоточных смывах и слезной жидкости инфицированных и контрольных цыплят

Значения представлены как средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего; значения над столбцами диаграммы показывают отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб в группе.



УДК 619:576.34:57.082.26

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ВНК-21/2-17

М.Н. Гусева¹, Д.В. Михалишин², А.А. Шишкова³, Д.С. Большаков⁴, Б.Л. Манин⁵, М.А. Шевченко⁶

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

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

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

⁴ старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

⁵ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin_bl@arriah.ru

⁶ аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты исследований оптимизации аминокислотного состава питательных сред, предназначенных для суспензионного культивирования клеток ВНК-21-2/17, путем изменения количества аминокислот, входящих в них.

Установили, что интенсивность прироста в контрольной и опытной питательной среде была 5,6; динамика роста клеток также была одинаковой.

Утилизация различных аминокислот в питательной среде происходила по-разному. Больше всего клетки потребляли глутамина, серина, тирозина, метионина (до 90, 55, 40 и 60% соответственно).

Был отмечен рост аланина (от 10% в контроле и до 60% в опыте). Количество триптофана и глутаминовой кислоты оставалось постоянным. Утилизация глицина, треонина, изолейцина проходила интенсивно первые 24 ч (7–13%, 10–18%, 34–41% соответственно в контроле — опыте). Затем концентрация несколько увеличивалась (на 7–45%, на 16–21%, на 20–50% соответственно в контроле — опыте).

При репродукции ящура в клетках, выросших в опытной и контрольной среде, значимых различий в выходе иммуногенных компонентов вируса не наблюдали.

Ключевые слова: клетки ВНК-21/2-17, аминокислоты, аминокислотный состав, гидролизат белков крови, питательная среда.

UDC 619:576.34:57.082.26

OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR ВНК-21/2-17 SUSPENSION CULTURE

M.N. Guseva¹, D.V. Mikhailishin², A.A. Shishkova³, D.S. Bolshakov⁴, B.L. Manin⁵, M.A. Shevchenko⁶

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

² Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shishkova@arriah.ru

⁴ Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

⁵ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: manin_bl@arriah.ru

⁶ post-graduate student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

SUMMARY

The paper demonstrates results of the research aimed at optimization of amino acid composition of the nutrient media used for ВНК-21/2/17 suspension cultivation by change of amino acid amount in such media.

Growth level in the control and tested media amounted to 5.6; cell growth dynamics was also similar.

In-media utilization of different amino acids was different. The cells mostly consumed glutamin, serine, tyrosine, methionin (up to 90%, 55%, 40% and 60%, respectively).

Growth of alanine level was reported (from 10% in the control sample and up to 60% in the test sample). Amount of tryptophan and glutamic acid remained stable. Glycine, threonine, isoleucine were actively utilized within the first 24 hours (7-13%, 10-18%, 34-41%, respectively in the control experiment). Hereafter, the concentration slightly increased (by 7-45%, by 16-21%, by 20-50%, respectively in the control experiment).

During the FMDV reproduction in the cells grown in the test and control media no significant differences in the yield of immunogenic virus components were reported.

Key words: ВНК-21/2-17 cells, amino acids, amino acid composition, blood-derived protein hydrolysate, nutrient medium.

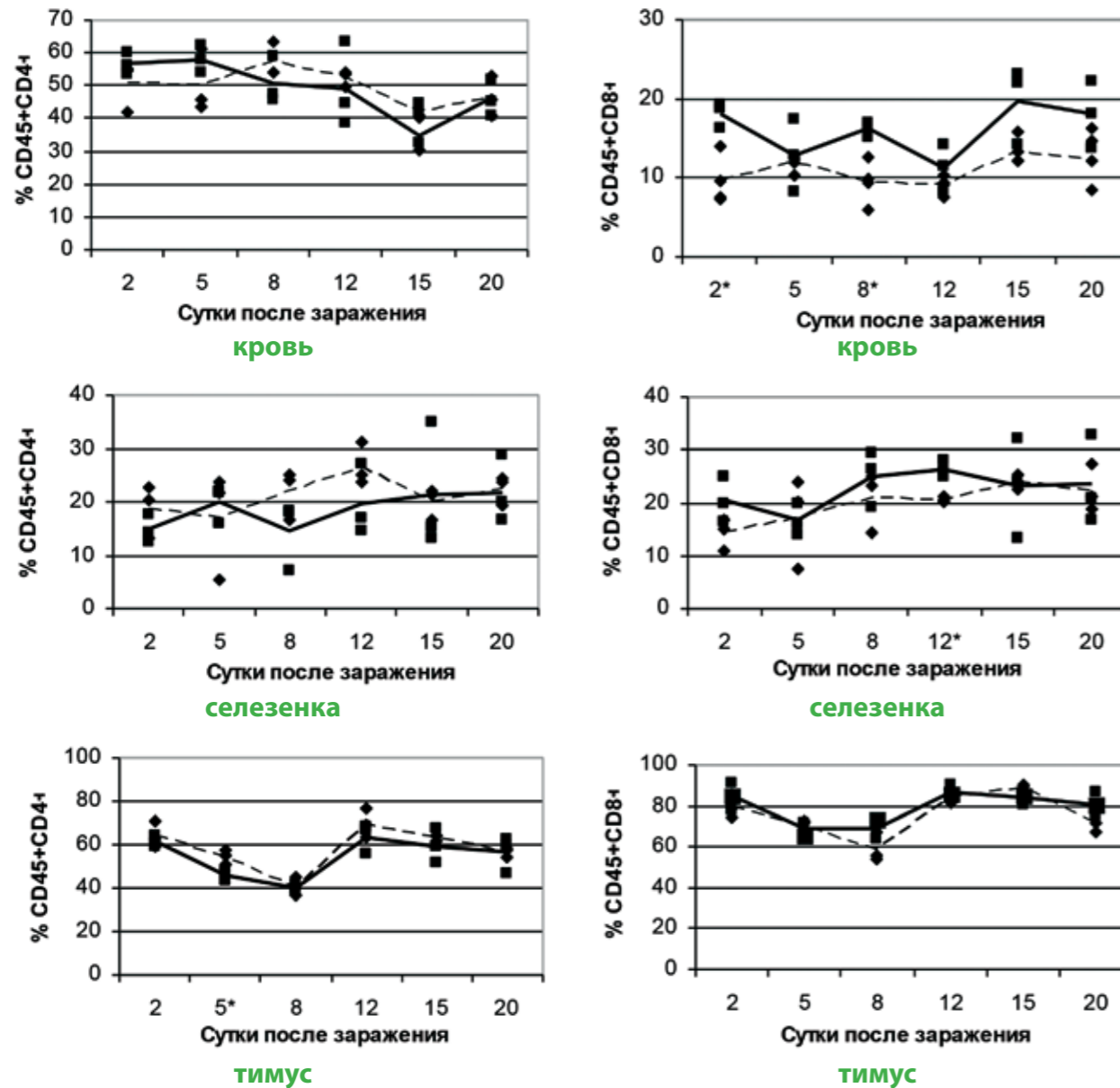


Рис. 5. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц

Отдельные символы представляют процентное количество клеток для индивидуальной птицы:

◆ — из контрольной группы, ■ — из инфицированной группы.

Линии представляют среднее арифметическое значение по группе:

сплошная линия — инфицированная группа, пунктирная линия — контрольная группа.

* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы, $p < 0.05$; Mann-Whitney U-test.

10. Methyltransferase-defective avian metapneumovirus vaccines provide complete protection against challenge with the homologous Colorado strain and the heterologous Colorado strain and the heterologous Minnesota strain / J. Sun, Y. Wei, A. Rauf [et al.] // J. Virol. — 2014. — Vol. 88. — P. 12348–12363.

11. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United States and comparison with subgroup A and B viruses / H. Shin, K.T. Cameron, J.A. Jacobs [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40 (5). — P. 1687–1693.

12. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV)

reveal a novel APV subgroup / M.H. Băyon-Auboyer, C. Arnauld, D. Toquin, N. Etteradossi // J. Gen. Virol. — 2000. — Vol. 81. — P. 2723–2733.

13. Pathogenic and immunogenic responses in turkeys following *in ovo* exposure to avian metapneumovirus subtype C / R.M. Cha, M. Khatri, M. Mutnal, J.M. Sharma // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 30–36.

14. Rautenschlein S. Local and systemic immune responses following infection of broiler-type chickens with avian metapneumovirus subtypes A and B / S. Rautenschlein, Y.H. Aung, C. Haase // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 10–22.

ВВЕДЕНИЕ

Все питательные среды для тканевых культур конструируются на основе сбалансированного солевого раствора с достаточной буферной емкостью. Чаще всего ими являются растворы Хенкса и Эрла. Неотъемлемым компонентом большинства ростовых сред является сыворотка крови животных (телячья, бычья, лошадиная). Также в состав сред могут входить и субстраты, полученные в результате частичной обработки естественных продуктов (эмбриональные экстракты, гидролизат лактальбумина, гидролизат белков крови, аминокислоты и т.д.), а также синтетические химические чистые вещества (аминокислоты, витамины, соли).

Было установлено, что для роста клеток позвоночных вне организма необходимы 13 аминокислот (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин, аргинин, глутамин, гистидин, тирозин, цистин) [2, 6].

Все аминокислоты участвуют в биосинтезе разнообразных белков и нуклеиновых кислот. Выполнение аминокислотой той или иной функции in vitro во многом зависит от условий культивирования. Одной из причин необходимости присутствия в среде пяти аминокислот, которые не требуются для целого организма, является ограниченный их синтез в культуре [5].

Некоторые авторы отмечают, что потребность в этих органических кислотах может различаться у клеток различных типов. Часто аминокислоты добавляют для того, чтобы либо компенсировать неспособность неко-

торых клеток синтезировать их, либо для компенсации их утечки в среду. Концентрация аминокислот обычно определяет максимальную плотность культуры, и при достижении равновесия влияет на выживаемость клеток и скорость их роста [16].

Различные аминокислоты потребляются из питательной среды растущими клетками с неодинаковой скоростью. Отмечено, что регулярное добавление аргинина (20–40 мг/дм³) и увеличение количества глутамина до 450 мг/дм³ благоприятствуют росту взвешенных культур [14]. Кроме того, в процессе культивирования аминокислоты, как правило, утилизируются только на 20–25%, при этом pH среды снижается обычно на 0,4–0,7 [8].

Широкое распространение получили питательные среды на основе ферментативных гидролизатов, которые эффективны при выращивании различных культур клеток [2–6, 9, 12]. За последние 10–15 лет в биотехнологии сформировано и интенсивно развивается направление, связанное с конструированием питательных сред, содержащих в качестве источников аминокислот ферментативные гидролизаты белков животных и растений [8].

Гидролизаты обычно содержат 16–20 аминокислот в вариabельной концентрации, а также полипептиды разной молекулярной массы [6, 14]. Гидролизат белков крови содержит достаточное количество аминокислот, необходимых для роста клеток ВНК-21/2-17 [4].

Целью нашей работы являлась оптимизация состава питательной среды для суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали:

- клетки ВНК-21/2-17;
- культиваторы металлические рабочим объемом 1800 дм³ (КМ);
- стандартную питательную среду для выращивания клеток, изготовленную согласно «Промышленному регламенту на производство вакцины против ящура различных типов», в состав которой дополнительно добавляют такие аминокислоты, как глутамин, аргинин, метионин, цистин, тирозин, триптофан, треонин, изолейцин [13].

– опытную питательную среду для выращивания клеток, содержащую в своем составе необходимые соли, гидролизат белков крови (ГБК), аминокислоты аргинин и глутамин в количествах, прописанных в «Регламенте» [13].

Суспензионную культуру клеток выращивали и заражали вирусом также согласно «Промышленному регламенту». Для заражения клеток использовали культуральный вирус ящура штаммов: «Азия-1 Шамир/Израиль 3/89», «О/ПанАзия-2», «А2171/Кабардино-Балкарский-2013».

Количество общего вирусного белка и компонентный состав устанавливали согласно «Методике определения содержания вирусспецифического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной РСК» [1].

Качественный и количественный аминокислотный состав питательных сред определяли на различных этапах культивирования клеток ВНК-21/2-17 в последнем пассаже перед заражением вирусом ящура.

Концентрацию клеток ВНК-21/2-17 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови, dA0.000.851, которая соответствует ТУ 64-1-816-84 [15].

Величину интенсивности прироста (ИП) рассчитывали как отношение конечной концентрации клеток и исходной в одном пассаже.

Для воспроизведения стандартных условий культивирования (объемы культивируемой клеточной суспензии, барботаж и др.) исследования проводили в шестом пассаже в трех повторностях.

Аминокислоты определяли на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия), снабженной УФ-детектором, немодифицированным кварцевым капилляром внутренним диаметром 50 мкм и эффективной длиной 65 см (общая длина 75 см). Применяли гидродинамический ввод пробы при 150 мбархс. Сбор и обработку данных проводили с программным обеспечением «Мультихром» и «Эльфоран» (ЗАО «Амперсенд», Россия) [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении аминокислотного состава ГБК и перевара по Хоттингеру, входящих в состав питательных сред [3], было отмечено, что добавление и ГБК, и перевара обогащает среду. Количество некоторых аминокислот увеличивается в 3–5 раз, к среде добавляются заменимые аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутаминовая кислота, пролин и серин, которые отсутствуют в стандартной среде Игла МЕМ (табл. 1).

Следующим этапом работы было исследование возможности культивирования суспензии клеток ВНК-21/2-17 в питательной среде, которая содержала необходимые соли, сыворотку крови и ГБК. К данной питательной среде добавляли только аргинин и глутамин, так как этих аминокислот было недостаточно в ГБК. Результаты исследований представлены на рис. 1, 2.

Из представленных на рис. 1 и 2 данных видно, что через 48 ч кратность прироста и в контроле, и в опыте была 5,6, динамика роста клеток также была одинаковой. Было отмечено, что pH в опытной среде изменялся на 8%, а в контрольной — на 12%, что, вероятно, связано с повышенным содержанием диаминодикарбоновых аминокислот, таких как лизин и гистидин (из ГБК), добавленных глутамина и аргинина.

На следующем этапе работы исследовали изменения аминокислотного состава питательных сред в процессе суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17. Результаты исследований представлены на рис. 3, 3а, 3в, 3с, 3д, 3е.

В начале культивирования клетки разбавляли питательной средой в соотношении 1:5, поэтому содержание аминокислот в питательной среде, содержащей и не содержащей клетки, различалось.

Из представленных данных видно, что в контрольной питательной среде содержание аминокислот в 1,2–2,2 раза было выше, чем в опытной (различия незначимы). Динамика утилизации аминокислот происходила одинаково как в контроле, так и в опыте.

В соответствии с представленными данными очевидно, что утилизация различных аминокислот в питательной среде происходила по-разному. Больше всего клетки потребляли глутамина, серина, тирозина, метионина, фенилаланина, гистидина (до 90, 55, 40, 60, 35 и 42% соответственно). Таким образом, вероятно, имен-

но эти аминокислоты непосредственно или опосредованно влияют на процессы биосинтеза, происходящие в клетках ВНК-21/2-17. Известно, что избыток какой-либо одной аминокислоты оказывает тормозящее влияние на обмен целого ряда других аминокислот. Такое торможение может быть как прямым (в том смысле, что нарушается обмен определенной аминокислоты), так и косвенным [9]. Поэтому избыток аминокислот в контрольной и опытной средах может отрицательно влиять на выживаемость клеток.

Был отмечен рост количества аланина (от 10% в контроле и до 60% в опыте). Количество триптофана и глутаминовой кислоты оставалось постоянным. Утилизация глицина, треонина, изолейцина проходила интенсивно первые 24 ч (7–13, 10–18, 34–41% соответственно в контроле — опыте). Затем концентрация несколько увеличивалась (на 7–45, 16–21 и 20–50% соответственно в контроле — опыте). В предыдущих исследованиях [3] была замечена такая же закономерность в последнем, 6 пассаже.

Полученные клетки заражали вирусом ящура следующих штаммов:

1. «О/ПанАзия-2»,
2. «А2171/Кабардино-Балкарский-2013»,
3. «Азия-1 Шамир/Израиль 3/89».

Результаты опытов представлены в табл. 2. В соответствии с представленными данными, мы не наблюдали значимых различий в иммуногенных компонентах вируса при репродукции ящура в клетках, выросших в опытной и контрольной среде (выход 146+75С с 1 млн клеток

Таблица 1
Качественный и количественный аминокислотный состав стандартной среды Игла МЕМ и производственной

№	Аминокислоты	Стандартная Игла МЕМ, мг/дм ³	Производственная среда, мг/дм ³
1	аланин	–	120
2	аргинин	126,4	120
3	валин	46,9	300–500
4	гистидин	41,9	250–300
5	глицин	–	58–66
6	глутаминовая кислота	–	30–60
7	изолейцин (в сумме с лейцином)	52,5+52,5	130–160
8	лизин	73,06	160–200
9	метионин	14,9	50
10	пролин	–	60–90
11	серин	–	80–105
12	тирозин	36,22	80–95
13	треонин	47,64	140–175
14	триптофан	10,2	42–58
15	фенилаланин	33,02	100–110
16	цистин	31,3	90–140
17	глутамин	292,3	510

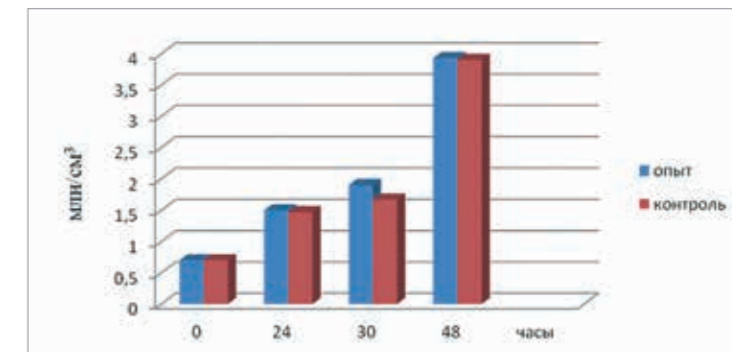


Рис. 1. Динамика роста клеток ВНК-21/2-17 при культивировании в среде без дополнительных аминокислот

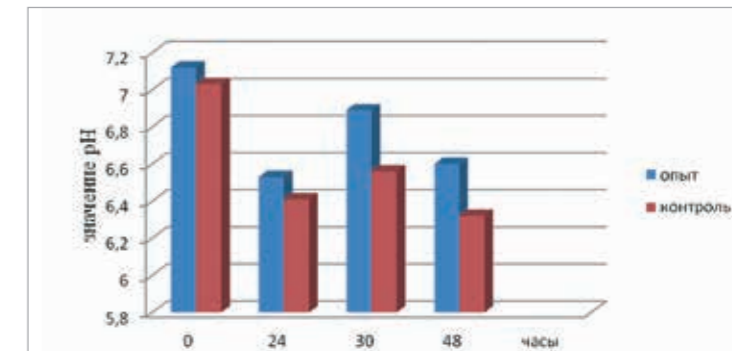


Рис. 2. Динамика изменения водородного показателя ионов при выращивании клеток ВНК-21/2-17 в среде без дополнительных аминокислот

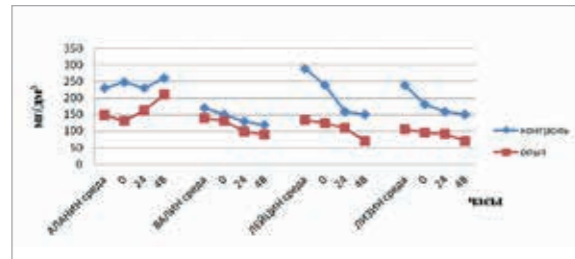


Рис. 3. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по аланину, валину, лейцину, лизину)

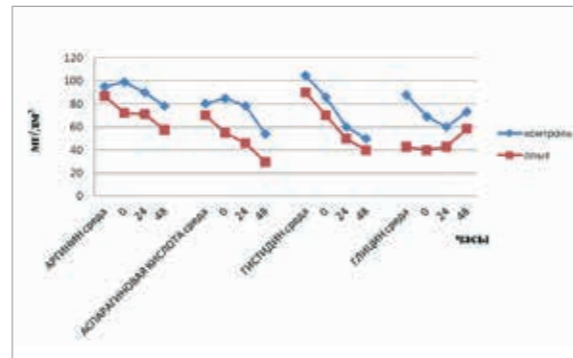


Рис. 3а. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по аргинину, аспарагиновой кислоте, гистидину, глицину)

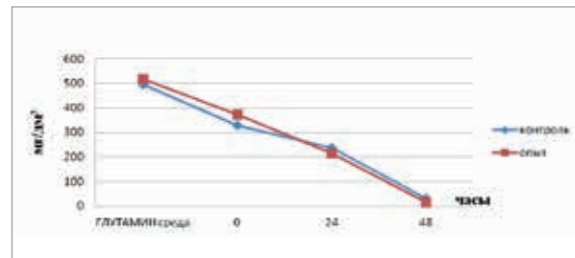


Рис. 3в. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по глутамину)

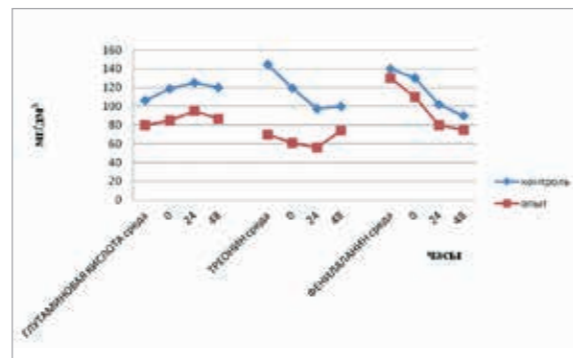


Рис. 3с. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по глутаминовой кислоте, треонину, фенилаланину)

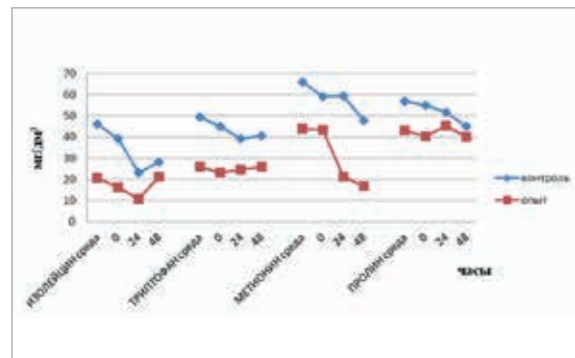


Рис. 3д. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по изолейцину, триптофану, метионину, пролину)

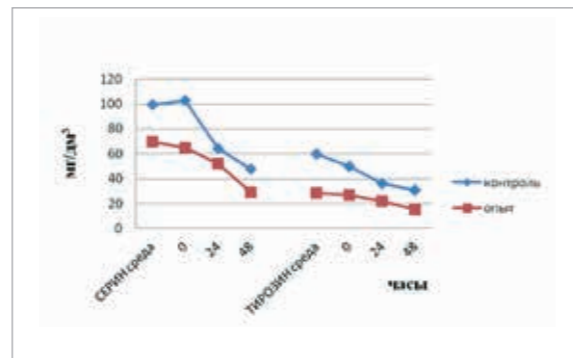


Рис. 3е. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по серину и тирозину)

варьировался у разных штаммов с 0,22 до 0,86 мкг/см³ Не было различий ни во времени репродукции вируса (14–17 ч), ни в процентах пораженных клеток (78–90%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведена попытка оптимизации состава питательной среды для суспензионного культивирования культуры клеток ВНК-21/2-17 путем изменения количества аминокислот, входящих в нее.

В среду дополнительно добавляли только глутамин и аргинин и исключали такие аминокислоты, как

метионин, цистин, тирозин, триптофан, треонин, изолейцин.

Установлено, что интенсивность прироста клеток была идентичной и в контрольной, и в опытной питательной среде; динамика роста клеток также была одинаковой.

Снижение количества аминокислот в питательной среде не оказывало отрицательного воздействия на репродукцию клеток и вируса. Количественная характеристика аминокислотного состава ГБК позволяет оптимизировать состав питательной среды.

Таблица 2
Влияние модифицированной питательной среды при выращивании суспензии клеток ВНК-21/2-17 на репродукцию вируса ящура

Среда	Штаммы вируса ящура	Конц-я клеток, млн/см ³	Количество вирусного белка, мкг/см ³			% пораж. кл.	Время репродукции вируса, ч
			После инакт. и очистки	146+75S, % к общему	146+75S с 1 млн		
Опыт	О/ПанАзия-2	3,5	1,83	1,53 (83,7)	0,44	78	17
	A2171/Кабардино-Балкарский-2013	3,1	1,20	0,62 (50,5)	0,20	89	16,5
	Азия-1 Шамир/Израиль 3/89	3,3	2,14	1,95 (91,1)	0,59	90	16
Контроль	О/ПанАзия-2	3,4	1,00	0,83 (83,4)	0,22	85	16
	A2171/Кабардино-Балкарский-2013	3,1	1,04	0,62 (59,2)	0,20	87	16
	Азия-1 Шамир/Израиль 3/89	3,5	3,29	3,00(93,2)	0,86	89	14

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондаренко А.Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. — Суздаль, 1994. — 92 с.
- Гизитдинов Н.Н. Питательные среды для выращивания культур клеток и вирусов // Достижения науки и техники. — 1992. — № 6. — С. 22–23.
- Гудимо О.С., Колесникова Н.А., Шошиев Л.Н. Культивирование клеток HeLa на питательных средах с гидролизатами сыворотки крови человека и животных // Вопросы вирусологии. — 1961. — № 3. — С. 375–379.
- Доценко В.В. Изготовление и исследование эффективности новых основ питательных сред для культивирования клеток и вирусов // Научные основы промышленного производства ветеринарных биологических препаратов: тез. докл. 5 Всерос. конф. — Щелково, 1996. — С. 36–37.
- Дьяконов Л.П. Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействия клеток с инъекционными патогенами // Цитология. — 1994. — Т. 36, № 6. — С. 503–504.
- Дьяконов Л.П., Строкина Г.М., Конюхов А.Ф. Гидролизаты молочных мышечных и растительных белков как основы питательных сред для культивирования клеток и вирусов // Цитология. — 1994. — Т. 36, № 6. — С. 522.
- Изучение изменений аминокислотного состава питательных сред в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17 / М.Н. Гусева, Д.А. Лозовой, Е.Г. Кузнецова [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2014. — № 3 (10). — С. 35–38.
- Конюхов А.Ф. Метаболические потребности клеточных культур сельскохозяйственных животных и конструирование питательных сред на основе отече-

- ственных компонентов // Ветеринарная иммунология и биотехнология. — 1988. — Т. 66. — С. 125–129.
- Куликова И.Л., Дьяконов Л.П., Жидков С.А. Культура клеток сосудов теленка и чувствительность клеток этой культуры к вирусу диареи крупного рогатого скота // Цитология. — 1992. — Т. 34, № 9. — С. 75.
- М-04-38-2009. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» / ООО «Люмэкс-маркетинг». — СПб., 2014. — (Корма, комбикорма и сырье для их производства). — 49 с.
- Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. — М.: Бином, 2011. — 633 с.
- Питательная среда для выращивания культур клеток животных: пат. 1025722 СССР, МПК³ С12N1/00 / Г.Е. Панкова, В.А. Сергеев, Л.П. Дьяконов [и др.]. — заявл. 30.10.81; опубл. 30.06.83, Бюл. № 24.
- Промышленный регламент на производство вакцины против ящура сорбированной моно- и поливалентной (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21) / ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2012. — 243 с.
- Строкина Г.М. Конструирование питательных сред для культивирования клеток животных на основе гидролизатов белков сыворотки молока // Питательные среды и сыворотки для культивирования клеток: тез. докл. Всесоюз. конф., Кольцово, 14–17 окт. 1991. — Новосибирск, 1991. — С. 12.
- ТУ 64-1-816-84. Камеры для счета форменных элементов крови и клеточных элементов спинно-мозговой жидкости. — С. 5.
- Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — 691 с.

ПРОБЛЕМА МАССОВОЙ ГИБЕЛИ САЙГАКОВ

А.В. Мищенко¹, В.А. Мищенко², А.К. Караулов³, А.В. Потехин⁴, А.П. Межнев⁵

¹ заместитель директора по НИР и мониторингу, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mischenko@arriah.ru

² главный научный сотрудник, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mishenko@arriah.ru

³ руководитель Информационно-аналитического центра, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: karaulov@arriah.ru

⁴ ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: potehin@arriah.ru

⁵ референт отдела охотничьего хозяйства Департамента государственной политики и регулирования в сфере охотничьего хозяйства Минприроды России

РЕЗЮМЕ

В статье приведен аналитический обзор сведений о причинах массовой гибели сайгаков в Казахстане. Показано, что существуют противоречивые данные об этиологии заболевания сайгаков: пастереллез (геморрагическая септицемия КРС), анаэробная энтеротоксемия, тимпания рубца, триптофан-индуцированная атипичная интерстициальная пневмония, неизвестный вирус. Все это служит основанием для того, чтобы при выяснении причин массового заболевания и гибели диких жвачных животных учитывались данные эпизоотологического обследования, дистанционного клинического осмотра животных, патологоанатомические изменения и результаты лабораторных исследований проб патологического материала от павших или вынужденно убитых особей. Для изучения причин массовой гибели диких жвачных животных необходимо привлечение высококвалифицированных специалистов, имеющих опыт в изучении данной патологии. Показано, что исследование проб клинического и патологического материала, отобранных от трупов вынужденно убитых и павших диких животных, должно проводиться по регламенту центров прецизионных исследований, в том числе для исключения инфекционной патологии и отравлений различной природы.

Ключевые слова: сайгак, *Saiga tatarica*, популяция, Казахстан, массовая гибель, геморрагическая септицемия крупного рогатого скота, *Pasteurella multocida* типа В, триптофан-индуцированная острая эмфизема и отек легких жвачных животных.

MASS DEATHS OF SAIGA ANTELOPES

A.V. Mischenko¹, V.A. Mischenko², A.K. Karaulov³, A.V. Potekhin⁴, A.P. Mezhnev⁵

¹ Deputy Director for Research and Monitoring, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mischenko@arriah.ru

² Senior Researcher, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mishenko@arriah.ru

³ Head of Information and Analysis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: karaulov@arriah.ru

⁴ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: potehin@arriah.ru

⁵ Administrative Assistant of the Hunting Sector Unit, Department of National Hunting Policy and Regulation, RF Ministry of Nature

SUMMARY

The paper presents analytical review of data concerning the reasons for mass deaths of saiga antelopes in Kazakhstan. It was demonstrated that the data on saiga antelope disease etiology are contradictory: pasteurellosis (bovine haemorrhagic septicemia), anaerobic enterotoxemia, ruminal tympany, *tryptophan-induced bovine atypical interstitial pneumonia* and unknown virus. It means that when investigating the reasons of mass morbidity and mortality in wild ruminants the data of epidemic survey, remote clinical examination, post mortem lesions and results of laboratory tests of pathological samples from dead and killed animals were taken into account. To study the reasons of mass deaths in wild ruminants it is necessary to involve highly qualified specialists experienced in this pathology research. It was shown that clinical and pathological samples collected from dead and killed wild animals shall be tested according to the procedure of precise testing centres also for the purposes of excluding infections pathology and intoxications of different nature.

Key words: saiga antelope, *Saiga tatarica*, population, Kazakhstan, mass deaths, bovine haemorrhagic septicemia, type B *Pasteurella multocida*, *tryptophan-induced acute emphysema* and *pulmonary oedema* of ruminants.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из сложных и чрезвычайно важных проблем эпизоотологии являются массовые инфекционные болезни диких животных. Многими исследователями доказано, что инфекционные болезни домашних и диких животных тесно связаны, чему способствует совместное использование пастбищ и водопоев, а также устойчивость возбудителей во внешней среде. Установлено, что дикие животные могут заражаться от домашних, но в то же время они также могут служить источником возбудителей для сельскохозяйственных животных [3, 13, 16, 22]. Поливекторность многих возбудителей способствует их широкому обмену между дикими и домашними животными.

В ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ВНИИЯ) еще со времен Советского Союза накоплен огромный опыт в изучении ящура у таких диких копытных животных, как северный и пятнистый олени, лоси, изюбри, маралы, яки, зубры, дзерены, косули, дикие кабаны, обитающие на территории СНГ и Монголии [3, 16]. Наиболее детально описано распространение ящура среди сайгаков в Прикаспии (Калмыкия) и в разных районах Казахстана [9, 16].

Следует отметить, что выявление возбудителей инфекционных болезней в пробах патологического материала, полученного от диких животных, значительно сложнее, чем в пробах от сельскохозяйственных животных [10]. Индикация микроорганизмов включает в себя четыре этапа: отбор проб, их соответствующая обработка, транспортировка в стационарную лабораторию, выделение и идентификация возбудителей. Достоверность результатов индикации возбудителей инфекционных болезней во многом зависит от правильности отбора проб. На 25-й Конференции Региональной комиссии Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) по Европе (сентябрь 2012 г.) было рекомендовано ветеринарным службам стран, имеющих общие границы, стимулировать научные исследования по изучению распространения болезней диких животных и обмениваться соответствующей информацией с другими государствами.

В настоящем сообщении представлены данные анализа научных публикаций и сообщений СМИ о причинах гибели сайгаков (*Saiga tatarica*) в Казахстане в 2010–2015 гг.

Сайгак — ключевой вид аридных экосистем Евразии, который, согласно информации о сокращении численности, был включен в Приложение II СИТЕС (1995 г.). Усугубившаяся к 2004 г. ситуация, когда произошло многократное сокращение численности вида на всем протяжении ареала (примерно с 1,6 млн в середине прошлого века до 55 тыс. гол.), заставила международное сообщество занести его в Красный список МСОП (IUCN) как «критически угрожаемый вид». В Евразии в результате деятельности человека в настоящее время мы имеем несколько изолированных друг от друга популяций сайгака [12, 15, 18–20]. Для *S. t. tatarica* это: европейская (или северо-западная прикаспийская), обитающая в регионе «Черные земли», волго-уральская, населяющая районы Западно-Казахстанской области и периодически мигрирующая на территорию России, трансграничная (Казахстан — Узбекистан — Туркменистан) устюртская и самая многочисленная — бетпакадалинская; а для *S. t. mongolica* (или, согласно новейшим сводкам, *borealis*) — две небольшие популяции, населяющие районы Манхан

и Шаргин Гоби (рис. 1). В Узбекистане сайгаки обитают в каракалпакской части плато Устюрт, куда основное поголовье мигрирует в зимний период с территории Казахстана. В отдельные годы сайгаки встречались в Северных Каракумах и в пойме реки Сырдарья, включая равнинную часть Ферганской долины. В особо суровые зимы известны заходы сайгаков в Туркменистан с Южного Устюрта [17].

Следует отметить, что до недавнего времени, благодаря налаженной системе борьбы с браконьерством в Казахстане, численность сайгака стала возрастать, в основном за счет увеличения бетпакадалинской популяции. Таким образом, обитающие в Казахстане сайгаки составляют примерно 70–80% всего мирового поголовья [12, 14, 21].

В Западном Казахстане (волго-уральская популяция) и на Устюрте массовый отел сайгака происходит в первой декаде мая, а далее к востоку (бетпакадалинская популяция) — во второй половине мая. Именно в этот период происходит бурный рост молодой травянистой растительности, например люцерны степной из семейства бобовых, потребление которой позволяет самкам быстро восстановиться после родов и способствует росту молодняка. Для понимания процессов, происходящих в организме сайгака, и рассмотрения возможных причин гибели животных отметим, что сайгаки активно кормятся в предрассветное время, когда молодые побеги растений покрыты росой. Во время массового рождения молодняка самки отгоняют самцов с мест отела, что является адаптивным признаком, присущим только данному виду животных [11, 23].

Массовая гибель сайгаков в Казахстане регистрировалась неоднократно: в мае 1981 г., когда погибли 100–180 тыс. сайгаков; в 1983 г. — 400 тыс. гол.; в феврале и марте 1984 г. — 100–250 тыс. гол.; в мае 1988 г. — около 500 тыс. животных [13, 20].

В период с 18 по 28 мая 2010 г. в окрестностях поселка Борсы Жанибекского района, расположенного в северо-западной части Западно-Казахстанской области, произошла массовая гибель сайгаков. Надо отметить, что гибель сайгаков наблюдалась на ограниченной территории, при обследовании которой были обнаружены трупы 7625 самок, 4250 новорожденного молодняка недельного возраста, который еще не перешел на подножный корм, и 45 самцов, что составляло более 30% от численности волго-уральской популяции. При более детальном обследовании территории выяснилось, что погибли те особи, которые паслись в ложбинах, а среди животных, которые паслись на возвышенных участках открытой степи, павших животных обнаружено не было. Традиционно именно в этом районе Западно-Казахстанской области на территории площадью около 50 км² весной происходит концентрация основной массы маточного поголовья волго-уральской популяции сайгаков.

Казахскими специалистами установлено, что в течение примерно 3–6 дней произошла внезапная гибель пасущихся взрослых особей, в то время как сайгачата, питающиеся в первые дни жизни только материнским молоком, были менее поражены и, скорее всего, погибали от голода уже после смерти самок [1, 6]. Визуальное наблюдение за больными животными показало: сильное угнетение, затрудненное дыхание, одышку, шаткую походку, слюнотечение, судорожные сокращения мышц. Дабы облегчить свое состояние, животные

стояли с поднятой головой и вытянутой вперед шеей, пытались вдохнуть больше воздуха. У некоторых животных отмечались хрипы при дыхании и пена у рта, а также тимпания, диарея. При вскрытии трупов павших сайгаков обнаруживали: гиперемия, уплотнение, отек и эмфизему легких. Отмечено увеличение печени и селезенки. В мае 2011 г. в том же районе и с аналогичными симптомами было обнаружено более 440 павших сайгаков.

Ветеринарными специалистами пробы патологического материала были отправлены для исследования в РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ, г. Гвардейский, Республика Казахстан). Результаты исследования на вирусы чумы мелких жвачных, оспы овец и катаральной лихорадки овец (блютанг) были отрицательными.

В связи со сверхострым течением болезни трудно представить, чтобы за очень короткий период в организме больных животных индуцировались вирусоспецифические антитела в титрах, выявляемых серологическими методами. Как правило, выявляемый уровень вирусоспецифических антител регистрируется на 7–10 сутки после начала заболевания. При исследовании в НИИПББ проб патологического материала от трупов сайгаков методом электронной микроскопии в пробах патологического материала от павших животных вирусы не обнаружены.

В цитоплазме эритроцитов были обнаружены гемоспоридии, которые были идентифицированы как тейлери. Пораженность кровяных клеток составляла 20–30%. Максимальное проявление тейлериоза среди домашних животных происходит ранней весной и совпадает с максимальной активностью клещей.

При бактериологических исследованиях патологического материала от павших сайгаков на дифференциальных средах были выделены два вида бактерий, которые в последующем были идентифицированы как *Pasteurella multocida* и *Clostridium*. Результаты проведенных исследований позволили сотрудникам НИИПББ сделать вывод, что сайгаки в ареале на территории Западно-Казахстанской области поражены гемоспоридиями (тейлериозом), что обусловлено весенней активностью иксодовых клещей в местах массового отела животных. Ряд исследователей считает, что массовая гибель сайгаков обусловлена пастереллезом, обострившимся на фоне тейлериоза и осложненным наличием клостридий [20].

Сотрудниками Западно-Казахстанского аграрно-технического университета и Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологий сделан вывод, что гибель сайгаков в 2010 и 2011 гг. была обусловлена анаэробной энтеротоксемией, вызванной *Clostridium perfringens* типа Д [2]. Подобное заключение было сделано Актюбинским филиалом республиканской ветеринарной лаборатории на основании данных исследований проб от павших сайгаков в мае 2015 г. [29]. Авторы экспериментально подтвердили факт пастереллоносительства клинически здоровыми сайгаками, что позволило им сделать вывод о малой вероятности массовой гибели сайгаков по причине пастереллеза. Также были исключены технологические версии и развитие тимпании от чрезмерного переедания зеленой травы в этиологии патологии сайгаков [14]. Другие исследователи считают, что версия о гибели сайгаков от пастереллеза или отравляющих веществ

менее убедительна по сравнению с предположением о падеже от тимпании [18].

Как указано выше, рождение молодняка у сайгака происходит в местах с густой растительностью, где преобладают такие растения, как степная люцерна, клевер, эспарцет, ковыль волосатик и другие, что является местом укрытия для новорожденных и хорошим кормом для самок. При анализе содержимого рубца павших сайгаков установлено, что основой питания животных перед гибелью были двудольные растения (бобовые и разнотравье), суммарное количество которых достигало 93%. На долю люцерны приходилось 26% [18]. Это же послужило основанием для вывода о том, что массовый падеж сайгаков бетпакдалинской популяции, так же как и волго-вятской популяции на территории Костанайской, Актюбинской, Акмолинской и Западно-Казахстанской областей, обусловлен острой тимпанией рубца [11].

Международная группа исследователей считает, что диагноз «пастереллез», основанный на выделении *Pasteurella multocida* из тканей органов погибших животных при отсутствии патологоанатомических и эпидемиологических показателей, не достоверен [7, 15, 23]. При вскрытии трупов павших сайгаков в основном выявлялись: гиперемия, эмфизема и отек легких. Авторы предполагают, что выделение *Pasteurella* и *Clostridia* в некоторых случаях не подвергается сомнению, но пока еще не доказано, что эти микроорганизмы сыграли главную роль в патогенезе заболевания.

Обнаруженные в тканях погибших животных такие бактерии, как *Pasteurella multocida* и *Clostridium*, не является чем-то необычным, так как эти микроорганизмы присутствуют в дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте клинически здоровых жвачных животных и, соответственно, могут заражать и заражают организм в благоприятный момент. Неаккуратное вскрытие трупов животных может также привести к контаминации проб этими бактериями.

Данные этих исследований позволили специалистам из Великобритании, Германии и Казахстана выдвинуть следующую гипотезу гибели сайгаков в Западной Казахстане в 2010 и 2011 гг. со смертностью более 75%: после окота взрослые самки переместились на территорию с довольно богатыми пастбищами, что совпало с периодом бурной вегетации. Поедание таких растений привело к вздутию желудка, легкой диарее и синдрому внезапной смерти в связи с нарушением дыхания, аналогичного «острому отеку легких» (отавной лихорадке) [7, 15].

Результаты проведенного анализа всех данных по изучению причин массовой гибели сайгаков позволили английским специалистам предположить, что в этиологии заболевания животных основную роль играет потребление быстрорастущих с аномальным содержанием влаги или нетипичных растений. Известно, что потребление такой растительности может привести к развитию у животных атипичной интерстициальной пневмонии, или эмфиземы легких, которая возникает у КРС, если он внезапно попадает на пастбища с буйной растительностью [7]. Известно, что в развитии атипичной интерстициальной пневмонии КРС играет роль L-триптофан. В англоязычной литературе указанная патология известна как «триптофан-индуцированная острая эмфизема и отек легких жвачных животных» и «fog fever» (отавная лихорадка). В связи с этим образ-



Рис. 1. Распространение сайгака в Евразии (http://www.grida.no/graphicslib/detail/saiga-antelope-populations_6e79)

цы растительности с пастбища, где отмечена массовая гибель сайгаков, были протестированы на содержание L-триптофана с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Известно, что в рубце бактерии *Lactobacillus* преобразуют L-триптофан в индол-уксусную кислоту, а затем в 3-метилендол. Указанное вещество через слизистую стенки рубца поступает в портальную вену и в последующем разносится по всему организму. В клетках Клара терминальных бронхолов происходит преобразование 3-метилендола в 3-метилениндоленин. Указанное вещество токсично для альвеолярных эпителиальных клеток (пневмоциты II), что и приводит к эмфиземе и отеку легких с последующей гибелью животного от удушья [25, 27, 28]. При вскрытии трупов павших жвачных животных указанная патология диагностируется как атипичная интерстициальная пневмония [28]. Результаты этих исследований показали, что пастбища, куда сайгаки приходили после отела, имели достаточный потенциал, чтобы вызвать атипичную интерстициальную пневмонию. В период гибели сайгаков травянистые растения находились в фазе интенсивного роста, листовая масса полностью отвечала зоотехническому термину «сочный травянистый корм». Авторы считают, что с целью предупреждения массовой гибели животных целесообразно проводить мониторинг пастбищных кормов и количества съеденных растений в период после отела [7].

Следующая массовая гибель сайгаков произошла в 2013 г., когда в Карагандинской и Акмолинской областях погибло около 3 тыс. особей, причиной назвали пастереллез [8].

С 12 мая 2015 г. в СМИ начали появляться сведения о гибели сайгаков в Костанайской (Амангельдинский и Жангельдинский районы), Актюбинской и Акмолинской (Жаркаинский и Жаксынский районы) областях Казахстана. По данным на 2 июня 2015 г. в Казахстане погибло более 132 тыс. сайгаков [24]. По информации Минсельхоза Казахстана, на 2 июня 2015 г. в Костанайской области утилизировано 113 309 туш сайгаков, в Акмолинской области — 9 386 трупов, а в Актюбинской

области погибло 9 634 животных. Обращают внимание данные о динамике выявления трупов павших сайгаков: 11 мая — 117, 13 мая — 1000, 18 мая — 10 тыс., 22 мая — 85 тыс., а 2 июня — 134 тыс. животных. По официально не подтвержденным данным некоторых СМИ Казахстана, первые случаи гибели сайгаков были выявлены в начале мая 2015 г. Из данных, опубликованных на сайте МЭБ, видно, что в 2015 г. во всех трех областях Казахстана заболело и погибло 134 252 сайгака из 152 336 животных, находящихся в популяции. Отмечена 100% летальность и 88,1% (67,2–93,2) смертность. По данным национального референтного центра Казахстана по ветеринарии, причиной гибели сайгаков стал пастереллез [5]. На рис. 2 приведены данные СМИ о случаях гибели сайгаков на территории Казахстана в период с 2010 по 2015 гг.

В конце мая 2015 г. был зарегистрирован падеж 6,5 тыс. сайгаков в Айтекебийском и Иргизском районах Актюбинской области. Местные ветеринарные специалисты предположили, что гибель может быть вызвана рядом причин, в том числе: пастереллезом, анаэробной энтеротоксемией, отравлением из-за переедания молодой сочной травы [4, 11].

У больных сайгаков отмечались клинические симптомы, а патологоанатомические изменения у трупов погибших сайгаков были аналогичны признакам, выявленным в 2010–2011 гг. При исследовании 33 проб патологического материала, отобранного от трупов павших сайгаков в Костанайской, Актюбинской и Акмолинской областях, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» 01.06.2015 г. из РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВИН МСХ Республики Казахстан, был выделен возбудитель — *Pasteurella multocida* типа В. При серологическом типировании изолятов *Pasteurella multocida* было установлено, что возбудитель относится к серотипу В:2 по классификации Cater — Heddle. Данный возбудитель у КРС вызывает геморрагическую септицемию. Однако патологоанатомические изменения, выявленные местными ветеринарными специалистами при вскрытии трупов павших

сайгаков, полностью отличаются от описанных поражений у КРС [26]. Сведений о регистрации геморрагической септицемии у сайгаков в доступной литературе найти не удалось.

Необходимо отметить, что *Pasteurella multocida* выделяется из смывов верхних дыхательных путей многих клинически здоровых жвачных животных, в том числе и сайгаков [14].

Результаты исследований по обнаружению геномов возбудителей ящура, чумы мелких жвачных животных, оспы овец и коз, блютанга были отрицательными.

Необходимо отметить, что эффективность выделения инфекционных агентов во многом лимитируется качеством проб, сроком от времени гибели животного до отбора проб патологического материала, а также температурой воздуха, при которой находились трупы. Большое значение имеют условия доставки проб патологического материала в лабораторию.

Развитие пастереллеза наступает на фоне снижения естественной резистентности организма животных, что может происходить после воздействия биогенных (в том числе и вирусов) и абиогенных факторов. К сожалению, в распоряжении ФГБУ «ВНИИЗЖ» не было проб сывороток крови сайгаков из пораженных популяций. Результаты исследований сывороток крови на наличие антител к вирусам позволили бы провести ретроспективный эпизоотологический анализ и выявить возможную первоначальную причину развития иммуносупрессии сайгаков.

Наиболее достоверные данные комплексных исследований по выяснению причин массовой гибели сайгаков могут быть получены с учетом результатов: эпизоотологического обследования, клинического осмотра больных животных, выявленных патологоанатомических изменений, подтвержденных результатами лабораторных исследований проб патологического материала, отобранного от туш вынужденно убитых и трупов павших сайгаков. Непременным условием является учет результатов биохимических исследований проб крови и токсикологических — кормов и воды. Данные, изложенные в доступных научных публикациях и сообщениях СМИ, свидетельствуют, что среди погибших сайгаков более 90% составляют самки. Отсутствие самцов объясняется тем, что во время охота самки отгоняют самцов. Самцы пасутся отдельно на других пастбищах. Гибель некоторого количества молодняка можно объяснить потреблением мокрой травы или тем, что они остались голодными после гибели самок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Противоречивые данные об этиологии заболевания сайгаков: пастереллез (геморрагическая септицемия КРС), анаэробная энтеротоксемия, тимпания рубца, триптофан-индуцированная атипичная интерстициальная пневмония, неизвестный вирус — требуют комплексного подхода при выяснении причин массового заболевания и гибели сайгаков, что позволит в дальнейшем получить всеобъемлющее научное объяснение этого природного феномена.

Рис. 2. Районы гибели сайгаков в Республике Казахстан в 2010–2015 гг.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айминов Б.А. Сайга в Иргиз-Тургайском резервате // Степной бюллетень. — 2013. — № 39. — URL: <http://savesteppe.org/ru/archives/10811>.
2. Анаэробная энтеротоксемия как основная причина гибели сайгаков в Западном Казахстане / Г.Г. Абсатиров, А.А. Сидорчук, У.Б. Таубаев [и др.] // Рос. вет. журнал. Мелкие домаш. и дик. животные. — 2013. — № 2. — С. 17–19.
3. Березин В.В. Экологическая эпизоотология диких теплокровных животных // Вестник с.-х. науки. — 1988. — № 5 (381). — С. 146–151.
4. В Актобинской области погибли уже более 10 тысяч сайгаков. — URL: <http://www.diapazon.kz/aktobe/aktobe-city/73052-v-aktyubinskoy-oblasti-pogiblo-uzhe-bolee-10-tysyach-saygakov.html>.
5. Версии массовой гибели сайгаков в Казахстане: пастереллез, гептил, половодье. — URL: <http://stormnews.ru/archives/18574>.
6. Грачев Ю.А., Бекенов А.Б. Массовая гибель сайгаков в Казахстане — погибло около 12000 особей // Saiga News. — 2010. — № 11. — С. 2–3.
7. Дистанционный и полевой анализ потенциальных причин падежа сайгаков в Западном Казахстане / Э. Дэнсер, В. Панион, Р. Кок [и др.] // Saiga News. — 2013. — № 16. — С. 16–18.
8. Елеусизов обвиняет правительство в массовой гибели сайгаков. — URL: <http://informburo.kz/novosti/obshchestvennye-deyateli-obvinyayut-pravitelstvo-v-massovoy-gibel-saygakov-5631.html>.
9. Локальная вспышка ящура у сайгаков / В.М. Хухоров, Х.Л. Хубиев, А.В. Шуваев [и др.] // Акт. вопросы вет. вирусологии: тез. докл. конф. — Владимир, 1978. — С. 169–171.
10. Мищенко В.А., Захаров В.М., Яременко Н.А. Проблема иммуномониторинга за инфекционными болезнями диких животных // Вирусные болезни с.-х. животных: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. — Владимир, 1995. — С. 110.
11. Новая версия причины гибели сайгаков — доктор бионаук. — URL: <http://incident.zakon.kz/4714262-svoju-versiju-gibeli-sajgakov-vydvinul.html>.
12. Переладова О.Б., Луцкекина А.А. Первые экстренные меры по поддержке охраны калмыцкой популяции сайги // Степной бюллетень. — 2001. — № 9. — С. 56–58.
13. Проблема вирусных инфекций у диких жвачных животных / В.А. Мищенко, В.В. Думова, А.В. Мищенко [и др.] // Ветеринария. — 2011. — № 5. — С. 8–9.
14. Результаты комплексного эколого-эпизоотологического мониторинга причин гибели сайгаков / Г.Г. Абсатиров, А.А. Сидорчук, У.Б. Таубаев [и др.] // Рос. вет. журнал. Мелкие домаш. и дик. животные. — 2013. — № 5. — С. 22–25.

15. Ретроспективная оценка причин гибели сайгаков *Saiga tatarica* в Западном Казахстане в 2010–2011 гг. / Р. Кок, Ю.А. Грачев, А. Жакирбаев [и др.] // Saiga News. — 2011/2012. — № 14. — С. 1–4.
16. Роль диких жвачных животных в распространении ящура / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, В.М. Захаров [и др.] // Ветеринария. — 2012. — № 11. — С. 3–5.
17. Сайгак в Узбекистане — современный статус и причины сокращения популяции / Е.А. Быкова, А.В. Есипов, А.Ю. Ефимов, Д. Головцов // Степной бюллетень. — 2006. — № 21–22. — URL: <http://savesteppe.org/ru/archives/2475>.
18. Сапанов М.К. Причины гибели сайгаков в Казахстане // Степной бюллетень. — 2011. — № 31. — URL: <http://savesteppe.org/ru/archives/4960>.
19. Случай массового падежа сайгаков в Центральном Казахстане // Степной бюллетень. — 2013. — № 39. URL: <http://savesteppe.org/ru/archives/10835>.
20. Случаи массовой гибели уральской популяции сайгаков в Казахстане / М.Б. Орынбаев, Р.А. Рыстаева, А.А. Керимбаев [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. — 2013. — № 1 (17). — С. 20–26.
21. Современное состояние и перспективы сохранения сайгака в Северо-Западном Прикаспии / В.М. Неронов, Н.Ю. Арылова, М.Ю. Дубинин [и др.] // Аридные экосистемы. — 2013. — Т. 19, № 2(55). — С. 5–14.
22. Соколов В.Е., Шишков В.П., Березин В.В. Проблемы эпизоотологии и патологии диких теплокровных животных и охрана животных мира // Успехи современной биологии. — 1988. — Т. 105, Вып. 2. — С. 269–283.
23. Цутер Ш. Массовая гибель сайгаков бетпақдалинской популяции в мае 2015 г. // Saiga News. — 2016. — № 1. — С. 6–8.
24. Число погибших в Казахстане сайгаков превысило 132 тысячи. — URL: <http://ria.ru/world/20150605/1068368034.html>.
25. Effects of 3-methylindole in cattle / G. Atkinson, J.F. Bogan, R.G. Breeze [et al.] // Br. J. Pharmac. — 1977. — Vol. 61, № 2. — P. 285–290.
26. Hemorrhagic septicemia // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — 2012. — Vol. 1, Chap. 2.4.12. — P. 732–744.
27. Schiefer B., Jayasekara M.U., Mills J.H.J. Comparison of naturally and tryptophan-induced bovine atypical interstitial pneumonia // Vet. Pathol. — 1974. — Vol. 11. — P. 327–339.
28. Soden S.D., Kerr R.W., Janzen E.D. Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection // J. Vet. Diagn. Invest. — 2000. — Vol. 12. — P. 510–517.
29. mir24.tv/news/incidents/1265876.

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ОВЕЦ К ВИРУСУ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ

М.С. Кукушкина¹, О.А. Рябикина², А.В. Кононов³, В.И. Диев⁴

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

² младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kosareva@arriah.ru

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

⁴ доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: diev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения чувствительности крупного рогатого скота и овец к вирусу нодулярного дерматита, зараженных вирулентным штаммом «Э-95» в экспериментальных условиях. Установлена более высокая чувствительность крупного рогатого скота к ВНД по сравнению с овцами, инфицирование сопровождалось тяжелым течением болезни, образованием на коже узлов, высокой температурой тела, отказом от корма, истощением. Овцы реагировали на введение вируса образованием узелков и отека в месте введения вирусной суспензии, конъюнктивита, кратковременным снижением аппетита и повышением температуры тела в течение 3–5 дней после заражения. Специфичность заболевания подтверждена в ПЦР и РДСК.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, крупный рогатый скот (КРС), овцы, заражение, реакция длительного связывания комплемента, реакция диффузионной преципитации.

STUDY OF EXPERIMENTALLY INFECTED CATTLE AND SHEEP SENSITIVITY TO LUMPY SKIN DISEASE

M.S. Kukushkina¹, O.A. Ryabikina², A.V. Kononov³, V.I. Diev⁴

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology),

FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kukushkina@arriah.ru

² Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kosareva@arriah.ru

³ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine),

FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

⁴ Doctor of Veterinary Medicine, Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: diev@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents the study results of sensitivity to lumpy skin disease virus of cattle and sheep experimentally infected with "E-95" virulent strain. It was established that cattle is more sensitive to LSDV in comparison to sheep: the disease in cattle was severe with fever, anorexia, cachexia and nodule development. Sheep reacted to virus inoculation with the development of nodules and swelling in the site of virus suspension injection, conjunctivitis, short-term anorexia and fever during 3–5 days post infection. The disease specificity was confirmed by PCR and prolonged complement fixation test.

Key words: lumpy skin disease virus, cattle, sheep, infection, prolonged complement fixation test, diffusion precipitation test.

ВВЕДЕНИЕ

Нодулярный дерматит (НД) имеет широкое распространение в разных странах Африканского континента, Ближнего Востока, в Турции, Греции, Азербайджане, Сирии и др. В 2015 г. наличие НД КРС зарегистрировано в России: в Республике Дагестан, Чеченской Республике и Республике Северная Осетия — Алания. Вирусы группы Нитлинг являются основным возбудителем нодулярного дерматита. Инкубационный период зависит от вирулентности возбудителя и путей его проникновения в организм и составляет в среднем 7 дней, но может продолжаться до 5 недель. Заболевание характеризуется наличием высокой температуры тела, конъюнктивитом, появлением на коже узелковых образований, увеличением лимфоузлов, отказом от корма, истощением. При тяжелом течении болезни поражаются ротовая полость, органы дыхания и пищеварения. Образование изъязвлений в дыхательных путях вызывает сильный отек, и животное гибнет от удушья. Болезнь продолжается 4 недели, а при осложнениях — дольше. У лактирующих коров поражается вымя, на нем образуются узелки, молоко густое с розовым оттенком. Часто заболевание осложняется вторичной, бактериальной инфекцией с поражением суставов, легких и других органов [1–7].

Источником инфекции является крупный рогатый скот и азиатские буйволы. Однако вирус бугорчатки может вызывать заболевание у овец и диких животных, таких как черная антилопа и жираф, которые оказались

восприимчивы к экспериментальному заражению. Заболевание у них сопровождалось образованием узелков на коже и в месте введения вируса. Оба животных пали, на 6 и 15 день после начала заболевания соответственно [8].

В то же время недостаточно изучена чувствительность КРС и овец к вирусу нодулярного дерматита КРС (ВНД КРС), что послужило основанием для проведения исследований в этом направлении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали КРС черно-пестрой породы 1,5-летнего и двух овец романовской породы 3-летнего возраста. Для заражения животных использовали суспензию штамма «Э-95» (Эфиопский) ВНД КРС, прошедшего 8 пассажей на перевиваемой культуре клеток яичников домашней козы (ЯДК-04) с титром $4,72 \pm 0,25 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Вирусную суспензию вводили КРС внутривенно в объеме $7,0 \text{ см}^3$ в 7 точек в области шеи, а овцам — по 6 см^3 в 10 точек в области бесшерстного участка кожи под лопаткой.

Учет результатов заражения проводили в течение 19 дней (срок наблюдения) по общему состоянию, температуре тела, образованию узлов на коже. Специфичность заболевания подтверждали исследованием методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), реакцией длительного связывания комплемента (РДСК) и реакцией диффузионной преципитации (РДП) суспензий проб, полученных из узлов, образовавшихся на коже, подкожной клетчатки, предлопаточного лимфоузла, отобранных после убоя быка через 20 дней после заражения. Учитывая наличие близкородственных связей вируса оспы овец, оспы коз и ВНД КРС, РДСК ставили согласно «Инструкции по применению набора для диагностики оспы овец и оспы коз в реакциях длительного связывания комплемента и диффузионной преципитации» (2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наблюдений показали, что у КРС через 6 и 9 дней после заражения ВНД отмечено образование узелков в месте инокуляции вируса в области шеи и живота размером 0,7–0,8 см, а на 12 день — повышение температуры тела до $40,5^\circ\text{C}$. Генерализованная форма заболевания, характеризовавшаяся образованием узелков внутрикожной локализации по всей поверхности тела, установлена на 13 день. Узелки на коже достигали размеров 3,0–3,5 см, а на отдельных участках сливались. Выявлена болезненность при пальпации кожи. Региональный предлопаточный лимфоузел увеличился до размеров гусиного яйца. У животного также наблюдали депрессию, снижение аппетита, учащенное дыхание, тахикардию, гиперемии ротовой и носовой полостей, конъюнктивит. Из носовой полости выделялся серозно-слизистый экссудат. В области подгрудка и путовых суставов отмечено образование обширных отеков. Температура тела достигала $41,1^\circ\text{C}$, к концу опыта у животного отмечено истощение (табл. 1).

У инфицированных ВНД овец на 5–6 сутки после заражения наблюдали развитие реакции в месте введения вирусной суспензии в виде образования отека плотной консистенции размером до $4 \times 8 \text{ см}$ и $5 \times 15 \text{ см}$ соответственно. Отмечалось угнетение животных че-

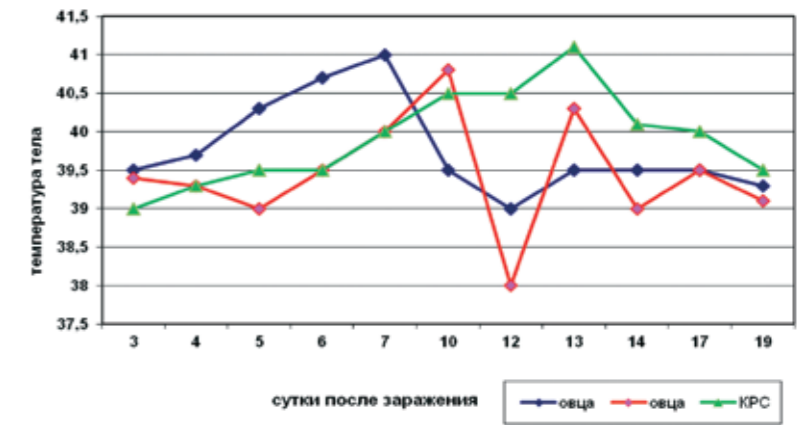


Рис. Температура тела у КРС и овец, зараженных вирусом нодулярного дерматита КРС

рез 6–7 дней после заражения, снижение аппетита, наличие конъюнктивита, серозного ринита, повышение температуры тела до $40,8^\circ\text{C}$, достигавшей максимального значения $41,0^\circ\text{C}$ на 7 и 10 дни после инокуляции вируса. В дальнейшем температура тела у овец понижалась и приходила в норму через 11–12 дней после заражения (рисунок). Спустя 10–14 дней отмечено уменьшение отека кожи в месте введения ВНД, однако при пальпации этих участков выявлено образование под кожей узелков размером с зерно фасоли. Эти изменения сохранялись в течение 17 дней (срок наблюдения). Других изменений в общем состоянии не обнаружено.

Таким образом, сравнительное изучение клинического проявления НД у КРС и овец показало, что у КРС после инфицирования наблюдается развитие типичных клинических признаков заболевания, а у овец сопровождалось образованием узелков, отека в месте введения вируса и кратковременным повышением температуры тела.

На втором этапе были проведены серологические исследования сыворотки крови и патологического материала.

Из проб патматериала — кожных узелков — готовили суспензию и исследовали на наличие специфической активности в ПЦР, а также из кожных узелков, подкожной клетчатки и лимфатических узлов в РДСК и РДП. Суспензию готовили на физиологическом растворе в соотношении 1:3.

В суспензии из кожных узлов методом ПЦР было установлено наличие генома ВНД.

В РДСК при постановке с гомологичной сывороткой крови КРС, больного нодулярным дерматитом, и сывороткой крови овец, полученной методом гипериммунизации животных антигеном вируса оспы, все пробы дали положительную реакцию, что подтверждает наличие антигенного родства возбудителей нодулярного дерматита и оспы овец. Титр проб при использовании сыворотки в рабочем разведении был 1:4–1:64 и 1:2–1:64 (табл. 2). Более высокая активность в пределах 1:16–1:64 установлена в суспензии из узлов на коже и подкожной клетчатки.

В РДП все пробы дали отрицательный результат, что, по-видимому, связано с недостаточной чувствительностью этой реакции.

Таблица 1
Результаты заражения КРС и овец вирусом нодулярного дерматита

Дни после заражения	Вид животных		
	КРС	овцы	
		1	2
6	наличие узелковых образований в месте введения ВНД	конъюнктивит, отек размером 4×8 см	серозный ринит, отек 4×8 см в месте введения ВНД
9	наличие узелковых образований 0,7–0,8 см в области введения ВНД и живота, отказ от корма	угнетение, отказ от корма, серозный ринит, отек 4×8 см в месте введения ВНД	серозный ринит, отек 5×15 см в месте введения ВНД
13	генерализация, температура тела 41,1°C, наличие узелковых образований по всей поверхности кожи, обширный отек в области подгрудка, путовых суставов, увеличение регионарного лимфоузла	общее состояние в норме, наличие отека в месте введения ВНД	общее состояние в норме, уменьшение отека
17	без изменений	общее состояние в норме, незначительное уплотнение в месте введения, под кожей выявлено наличие узелковых образований размером с зерно фасоли	общее состояние в норме, незначительное уплотнение в месте введения, под кожей выявлено наличие узелковых образований размером с зерно фасоли
19	наличие узелковых образований по всей поверхности кожи, увеличение предлопаточных, подколленных, подчелюстных узлов, истощение	без изменений	без изменений

Таблица 2
Специфическая активность в РДСК суспензии из органов и тканей КРС, зараженного ВНД

Вид материала	Титр с сыворотками крови	
	КРС, больного нодулярным дерматитом	гипериммунная овец к оспе овец
Кожные узелки	1:16	1:2
Подкожная клетчатка узелка	1:64	1:64
Предлопаточный лимфоузел	1:4	1:2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заражение вирусом нодулярного дерматита сопровождалось заболеванием крупного рогатого скота в тяжелой форме с образованием по всему телу узлов (бугров), наличием высокой температуры тела с отказом от корма, истощением.

При экспериментальном заражении овец вирусом нодулярного дерматита отмечено наличие местной реакции на введение вируса, с образованием узелков и отеков в месте инокуляции вирусной суспензии, температурной реакцией в течение 3–4 дней.

Наряду с ПЦР идентификация возбудителя в пробах патологического материала проведена в РДСК, с использованием «Набора для диагностики оспы овец и оспы коз в реакциях длительного связывания комплемента и диффузионной преципитации», что подтверждает наличие близкородственных антигенных связей между вирусом оспы овец и нодулярного дерматита крупного рогатого скота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуненков В.В. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота // Сб. научных трудов ВГНКИ. — М., 2005. — Т. 66. — С. 46–54.
2. Клинические признаки у крупного рогатого скота, зараженного вирусом нодулярного дерматита (бугорчатка) / В.И. Диев, А.С. Назаров, Г.А. Блотова, В.М. Захаров // Вирусные болезни с.-х. животных: тез. докл. Всерос. научно-практ. конф. — Владимир, 1995. — С. 214.

3. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, А.В. Кононов [и др.] // Сб. научных трудов Междунар. учебно-метод. конф., посвящ. 95-летию кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. — М., 2015. — С. 127–135.

4. Рябикина О.А., Диев В.И., Кукушкина М.С. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (обзор литературы) // Актуальные вопросы вет. биологии. — 2015. — № 4 (28). — С. 45–52.

5. Lumpy skin disease // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — 7th ed. — 2012. — Vol. 1, Chap. 2.4.14. — P. 762–774.

6. Lumpy skin disease in Jordan: Disease emergence, clinical sing, complications and preliminary — associated economic losses / S.M. Abutarbush., M.M. Ababneh, J.G. Al Zoubi [et al.] // Transbound. Emerg. Dis. — 2013. — Vol. 62, № 5. — P. 549–554.

7. Scientific opinion on lumpy skin disease // EFSA J. — 2015. — Vol. 13, № 1. — doi: 10.2903/j.efsa.2015.3986.

8. Young E., Basson P.A., Weiss K.E. Experimental infection of game animals with lumpy skin disease virus prototype strain Neethling // Onderstepoort J. Vet. Res. — 1970. — Vol. 37. — P. 79–87.



УДК 619:616.98:578.825.1:615.371

ИЗУЧЕНИЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАКЦИН ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ ИЗ МАРКИРОВАННОГО ШТАММА

Е.П. Баборенко

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

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты сравнительных испытаний двух вакцин производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»: «Вакцины против болезни Ауески свиней из маркированного штамма инактивированной эмульгированной» и «Вирусвакцины против болезни Ауески свиней и овец сухой культуральной из маркированного штамма «ВК». Приведены данные изучения иммуногенных свойств после контрольного заражения.

Ключевые слова: болезнь Ауески (БА), маркированный штамм, антигенность, иммуногенность.

UDC 619:616.98:578.825.1:615.371

STUDY OF POSTVACCINAL IMMUNITY AFTER USE OF MARKED STRAIN-BASED VACCINE AGAINST AUJESZKY'S DISEASE IN PIGS

E.P. Baborenko

Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: baborenko@arriach.ru

SUMMARY

The results of comparative testing of the following two vaccines produced by the FGBI "ARRIAH": inactivated emulsion marked-strain based vaccine against Aujeszky's disease in pigs and dry cultural marked-BK strain virus vaccine against Aujeszky's disease in pigs and sheep are presented. The results of immunogenic property study after challenge are given.

Key words: Aujeszky's disease, marked strain, antigenicity, immunogenicity.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Ауески (БА) — остро протекающая болезнь многих видов домашних и диких животных, проявляющаяся расстройством ЦНС, сильным зудом и расчёсами у всех животных, кроме свиней.

Протекает энзоотически, наблюдается в любое время года и проявляется признаками поражения нервной, репродуктивной и респираторной систем. У супоросных свиноматок заболевание приводит к мумификации плода, абортам. Во время острых вспышек заболевания смертность среди новорожденных поросят достигает 100%. Инкубационный период длится от 2 до 15 дней, иногда дольше. Восприимчивость к возбудителю зависит от патогенных свойств штамма вируса, возраста животного, а также воздействия стрессовых факторов. При заболевании свиней в возрасте до 10 дней погибает около 90% заболевших поросят, в возрасте 10–20 дней — 60%, в возрасте до 35 дней — 30%.

Болезнь Ауески на территории России регистрируется ежегодно. По данным ФГБУ «Центр ветеринарии» на территории РФ за период с 1996 по 2009 гг. было зафиксировано 126 вспышек заболевания, а за 2011–2013 гг. было зафиксировано по 1 вспышке в год [1]. Зарегистрированные вспышки БА за последнее время на территории РФ включали типичные случаи заболевания с выраженной клинической картиной и большим уровнем гибели свиней.

Несмотря на официально декларируемое благополучие, утверждать о нем как о действительности не приходится, поскольку распространены скрытые формы течения заболевания, и выявляемые специфические антитела к вирусу БА после применения традиционных вакцин не позволяют дифференцировать инфицируемых животных от вакцинируемых.

При использовании традиционных (немаркированных) вакцин затруднительно вовремя определить циркуляцию эпизоотических штаммов вируса БА в популяции вакцинированных свиней, что в конечном счете осложняет своевременную лабораторную диагностику заболевания, не позволяет осуществлять контроль за оздоровлением хозяйства от БА на привитом поголовье и корректировать мероприятия по борьбе с данным заболеванием [2].

В системе ветеринарно-санитарных мероприятий в свиноводстве в современных условиях одно из ведущих мест занимает профилактика инфекционных

болезней, в первую очередь специфическая иммунизация животных. Правильное и своевременное ее проведение позволяет предотвратить возникновение и распространение инфекционных болезней и существенно снизить возможные экономические потери.

Хозяства, осуществляющие стратегию борьбы против БА с применением вакцинопрофилактики, должны придавать первостепенное значение проблеме дифференциации инфицированных свиней (вирусоносителей) от вакцинированных, что позволяет применение только маркированных вакцин. Однако данная практика не столь широка, как этого требует эпизоотическая ситуация. В совокупности объем применения маркированных вакцин в России не превышает 20% от общего числа иммунизаций свиней против БА [2].

В ФГБУ «ВНИИЗЖ» ведутся разработки по созданию новых эмульсионных инактивированных вакцинных препаратов с использованием маркированного штамма вируса БА для дифференциации поствакцинального иммунитета от вакцинального у привитых животных.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка антигенных свойств двух типов вакцин: вакцины из маркированного штамма «ВК» вируса БА инактивированной эмульгированной и вирусвакцины против БА свиней и овец сухой культуральной, а также длительности иммунитета и иммуногенных свойств у разработанной вакцины против БА свиней из маркированного штамма инактивированной эмульгированной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцины:

– против БА свиней из маркированного штамма инактивированная эмульгированная. Вакцина изготовлена из маркированного — gP1-негативного штамма «ВК» вируса БА свиней, выращенного на перевиваемой культуре клеток, инактивированного 1,2 аминоэтилэтиленимином с добавлением масляного адьюванта до 70% от объема препарата.

– вирусвакцина против БА свиней и овец сухая культуральная из маркированного штамма «ВК». В состав вакцины входит маркированный — gP1-негативный штамм «ВК» вируса БА, выращенный на перевиваемой культуре клеток, с добавлением в качестве стабилизатора гидролизата лактоальбумина, сахарозы и желатинизы.

Лабораторные животные. В опыте использовали клинически здоровых поросят в возрасте 2 месяцев живой массой 20–25 кг, полученных из благополучных по БА и другим инфекционным заболеваниям хозяйств.

Культура клеток. В работе использовали перевиваемую культуру клеток новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

Титрование вируса. Определение титра инфекционности вируса БА свиней проводили путем титрования на перевиваемой культуре клеток. Оценку титра проводили по методу Кербера [3].

Для контрольного заражения экспериментальных поросят использовали вирулентный эпизоотический изолят «Нижегородский 2007» вируса БА, выделенный от свиней из Нижегородской области в 2007 г., с титром инфекционности $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Вирусовыделение. Отбор мукозальных смывов из носовых раковин животных проводили через 2, 4, 6, 8, 10, 14 суток после контрольного заражения. Пробы мукозальных смывов от животных после контрольного

заражения вирусом БА инокулировали на 2-суточный монослой культуры клеток с целью выделения вируса БА. О наличии вируса БА в испытуемых пробах судили по появлению характерного ЦПД в чувствительной культуре клеток.

Для дифференциального исследования сывороток крови опытных животных на наличие антител против вируса БА использовали наборы «HerdChek PPV gB Antibody Test Kit» (IDEXX, USA) и «HerdChek PPV gI Antibody Test Kit» (IDEXX, USA). Учет результатов проводился согласно инструкции по применению набора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы проводилось изучение антигенной активности и длительности напряженности иммунитета у подсвинков, иммунизированных вакциной против БА свиней из маркированного штамма инактивированной эмульгированной. Испытания проводили на 20 серонегативных к вирусу БА поросят. Вакцину вводили однократно внутримышечно в верхнюю треть шеи в дозе $2 \text{ см}^3/\text{гол}$. За животными в течение 135 суток вели клиническое наблюдение и периодически отбирали пробы крови. Сыворотки крови на наличие специфических антител к вирусу БА исследовали в дифференцирующем наборе ИФА фирмы IDEXX. Результаты проведенных работ представлены в табл. 1.

Анализ данных, приведенных в табл. 1, показывает, что специфические антитела к вирусу БА выявлялись с 14 дня после иммунизации у 70% подсвинков в группе. К 25 суткам специфические антитела выявлялись у всех животных. Среднее значение показателя оптической плотности s/p по гликопротеину gB на 14 сутки составило $0,35 \pm 0,07$ и к 135 суткам (срок наблюдения) — $0,19 \pm 0,08$, что говорит о достаточной антигенной активности вакцины. Антитела к гликопротеину gI отсутствовали в пробах сыворотки крови на всех сроках отбора, что свидетельствует о выработке специфических антител после применения маркированной вакцины.

Клиническое наблюдение показало, что общей гипертермической реакции, отказа от корма или угнетения у вакцинированных животных не наблюдалось.

У части животных (23%) на месте введения вакцины наблюдали незначительные уплотнения с образованием выраженного «депо», общая площадь измененной ткани не превышала 1 см.

Следующим этапом исследований являлось сравнительное изучение антигенной активности двух вакцин производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»: вирусвакцины против БА свиней и овец сухой культуральной и вакцины против БА из маркированного штамма инактивированной эмульгированной — в полевых условиях, в одном из свиноводческих хозяйств. Опыт проводили на двух группах животных в возрасте 80 суток по 50 голов в каждой.

Животных вакцинировали согласно «Инструкции по применению...» применительно к вакцинам. Отбор проб проводили в обеих группах как до, так через 21 и 35 суток после иммунизации. Пробы сыворотки крови исследовали методом ИФА. Результаты испытаний представлены в табл. 2.

Наблюдение за вакцинированными животными показало, что обе вакцины безвредны и ареактогенны. Из табл. 2 видно, что на 21 сутки после вакцинации вирусвакциной сухой культуральной 82% животных имели

Таблица 1

Антигенная активность вакцины против болезни Ауески свиней из маркированного штамма инактивированной эмульгированной на подсвинках

Гликопротеин вируса БА	Показатели	Уровень антител к вирусу БА после вакцинации (s/p)						
		до вакц.	14 суток	25 суток	46 суток	56 суток	90 суток	135 суток
gB	иссл./полож.	20/0	20/14	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
	ср. значение s/p, M±S	1,2±0,07	0,35±0,07	0,3±0,03	0,18±0,05	0,08±0,02	0,08±0,02	0,19±0,08
gI	иссл./полож.	–	20/0	20/0	20/0	20/0	20/0	20/0
	ср. значение s/p, M±S	–	0,98±0,09	0,98±0,1	0,92±0,1	0,95±0,07	0,97±0,1	1,0±0,1

s/p ≤ 0,6 — положительная сыворотка; 0,7–0,6 — сомнительная сыворотка; > 0,7 — отрицательная сыворотка.

специфические антитела против вируса БА, к 35 суткам — 90%. В то время как после иммунизации вакциной эмульсионной инактивированной на 21 сутки после вакцинации 92% животных имели специфические антитела против вируса БА, к 35 суткам — 100% соответственно.

В исследуемых пробах сывороток крови на 21 сутки после вакцинации у поросят в обеих группах средние значения s/p по гликопротеину gB имели примерно одинаковые значения $0,14 \pm 0,07$ и $0,12 \pm 0,05$ соответственно. На 35 сутки в группе, вакцинированной инактивированной эмульгированной вакциной, значения s/p по гликопротеину gB уменьшились почти в 2 раза и составили $0,069 \pm 0,007$, т.е. ревакцинация усилила иммунный ответ. В то время как в группе животных, вакцинированных вирусвакциной сухой культуральной, значения s/p по гликопротеину gB остались почти неизменными $0,14 \pm 0,07$ (21 сутки) и $0,12 \pm 0,03$ (35 сутки). В то же время антитела к гликопротеину gI отсутствовали в пробах сыворотки крови на всех сроках отбора у всех испытуемых животных, что свидетельствует о выработке специфических антител после применения обеих маркированных вакцин.

За животными был установлен постоянный клинический контроль. Температура тела и основные физиологические показатели у привитых свиней на протяжении всего периода эксперимента оставались в пределах нормы, в месте введения препарата у части животных,

вакцинированных инактивированной эмульгированной вакциной, прощупывалась небольшая припухлость диаметром не более 1–2 см.

Протективную функцию поствакцинального иммунитета вакцины против БА из маркированного штамма инактивированной эмульгированной изучали на каждой пятой серии вакцины методом контрольного заражения. Для контроля иммуногенной активности вакцины каждый раз использовали по 10 серонегативных поросят. Подсвинков распределяли в группы по 6 и 4 головы. Шести подсвинкам вводили вакцину в дозе $2 \text{ см}^3/\text{гол}$. внутримышечно в верхнюю треть шеи, с ревакцинацией на 21 сутки. Через 14 дней после двукратной иммунизации 6 вакцинированных животных и 4 контрольных (непривитых) поросят подвергали контрольному заражению вирулентным штаммом вируса БА с инфекционным титром $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ интраназально в объеме 4 мл/гол. (доза $4 \times 10^6 \text{ ТЦД}_{50}$). Результаты испытаний по определению антигенной активности и протективного эффекта вакцины после контрольного заражения вирулентным штаммом вируса БА представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, все животные до иммунизации были серонегативными по отношению к вирусу БА. В группе вакцинированных животных через 21 сутки 100% животных имели специфические антитела к вирусу БА, к 35 суткам перед заражением средний уровень антител имел четкую положительную динамику.

Таблица 2

Уровень специфических антител к вирусу БА у подсвинков, вакцинированных вирусвакциной сухой культуральной и инактивированной эмульгированной

Вакцина	Гликопротеин	Показатели	До вакцин.	21 сутки*	35 сутки
Вирусвакцина против БА свиней и овец сухой культуральной	Ауески (gB)	исследовано/положит.	50/0	50/41	50/45
		средний уровень антител	0,99±0,025	0,140±0,073	0,120±0,034
	Ауески (gI)	исследовано/положит.	50/0	50/0	50/0
		ср. значение s/p, M±S	1,1±0,1	0,98±0,07	1,03±0,09
Вакцина против БА инактивированная эмульгированная	Ауески (gB)	исследовано/положит.	50/0	50/46	50/50
		ср. значение s/p, M±S	0,92±0,025	0,122±0,058	0,069±0,007
	Ауески (gI)	исследовано/положит.	50/0	50/0	50/0
		ср. значение s/p, M±S	1,0±0,09	0,98±0,07	1,1±0,07
Возраст поросят, дней			80	102	117

* ревакцинация;

s/p ≤ 0,6 — положительная сыворотка; 0,7–0,6 — сомнительная сыворотка; > 0,7 — отрицательная сыворотка.

Таблица 3

Уровень антител к вирусу БА у поросят, вакцинированных вакциной против БА из маркированного штамма инактивированной эмульгированной, до и после контрольного заражения вирулентным штаммом

Группа животных	Кол-во жив-х в группе	Среднее значение s/p по группе						Наличие клинических признаков		
		До иммуниз.		21 сутки*		35 сутки**			Через 14 дней после контрольного заражения	
		gB	gI	gB	gI	gB	gI		gB	gI
Вакцинированные серия №1	6	0,9	0,38	0,98	0,13	1,1	0,22	0,8	–	
Контроль	4	0,9	–	–	1,0	1,0	0,28	0,37	+	
Вакцинированные серия № 5	6	0,9	0,26	0,92	0,17	0,9	0,42	0,8	–	
Контроль	4	0,9	–	–	0,9	0,9	0,33	0,42	+	
Вакцинированные серия №10	6	1,0	0,27	0,98	0,16	0,9	0,09	0,8	+	
Контроль	4	1,0	–	–	0,9	1,0	0,37	0,46	–	

* ревакцинация; ** контрольное заражение;

«+» — повышенная температура, отказ от корма, «–» — отсутствие клинических признаков болезни;

s/p ≤ 0,6 — положительная сыворотка; 0,7–0,6 — сомнительная сыворотка; > 0,7 — отрицательная сыворотка;

Необходимо отметить, что по гликопротеину gI на сроках отбора проб через 21 и 35 суток результаты были отрицательными. Перед контрольным заражением животные в контрольных (невакцинированных) группах оставались серонегативными по отношению к вирусу БА. Через 14 суток после заражения эпизоотическим изолятом вируса БА у всех животных были выявлены специфические антитела к вирусу БА. Однако, если у поросят контрольных групп были выявлены антитела как на гликопротеин gB, так и на гликопротеин gI, то у вакцинированных животных были обнаружены антитела только на вакцинный штамм вируса БА. Отсутствие антител к gI вируса БА у поросят опытных групп свидетельствует о поствакцинальной защите от репродукции полевого изолята ВБА.

За животными был установлен постоянный клинический контроль. При клиническом наблюдении за свиньями на 2–14 сутки после заражения у животных из контрольных групп регистрировали значительное угнетение, отсутствие аппетита (анорексию), конъюнктивиты, у всех животных отмечали гипертермию, которая была выше и более продолжительной, чем в вакцинированных группах. Максимальное значение составляло 41,7°C. В вакцинированных группах на 2–4 сутки после заражения отмечали незначительное снижение аппетита у всех животных и их легкое угнетение. Все животные после контрольного заражения во всех группах остались живы.

Анализ исследования мукозальных смывов показал, что в течение всего срока наблюдения (14 суток) вирус выделения у животных из группы вакцинированных в основном фиксировали на 1–3 сутки в незначительных инфекционных титрах $0,63 \pm 0,07$ Ig ТЦД₅₀/см³ по группе. В пробах сывороток крови, отобранных у контрольных животных, вирулентный вирус выделялся на протяжении всего периода наблюдений, инфекционный титр вируса в среднем по группе составлял $3,64 \pm 0,42$ Ig ТЦД₅₀/см³.

Полученные нами данные показывают, что животные с достаточными значениями антител против вируса БА не выделяют вирус во внешнюю среду, и при высоком иммунном статусе вакцинированные животные не становятся латентными переносчиками болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцина против болезни Ауески свиней из маркированного штамма инактивированная эмульгированная производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» безвредна и ареактогена. Обладает антигенной и иммуногенной активностью, о чем свидетельствует положительная динамика антителообразования у привитых поросят начиная с 14 суток после иммунизации.

Отрицательные значения специфических антител к гликопротеину gI в пробах сывороток крови у иммунизированных животных на всех сроках отбора свидетельствуют о выработке у них специфических антител, в то время как у контрольных свиней антитела к гликопротеину gI выявлялись.

Данные клинического и серологического исследования показали устойчивость вакцинированных животных к инфекционному (полевому) вирусу БА. Полученные результаты подтверждают, что вакцинированные животные не выделяют вирус во внешнюю среду, тогда как контрольные свиньи в опытах проявили яркие признаки заболевания с длительным выделением вируса во внешнюю среду.

Вакцина против болезни Ауески свиней из маркированного штамма инактивированная эмульгированная после двукратного применения по антигенной активности не уступала вирусвакцине против болезни Ауески свиней и овец сухой культуральной из маркированного штамма «ВК».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шевцов А.А., Баборенко Е.П., Шевченко И.В. Маркированная вакцина в борьбе с болезнью Ауески у свиней // АПК Юг (Ростов-на-Дону). — 2011. — № 3 (58). — С. 28–29.
- Шевцов А.А., Баборенко Е.П., Шевченко И.В. Болезнь Ауески свиней, современная эпизоотическая ситуация, меры борьбы и профилактика = Aujeszky's disease of swine, present day epidemic situation, control and prevention measures // Ветеринария сегодня. — 2012. — № 3. — С. 16–23.
- Методические рекомендации по анализу параметров в системах «доза-эффект» с альтернативным способом оценивания / В.Ю. Кулаков, С.Н. Колосов, А.В. Константинов [и др.] // ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2016. — 31 с.

УДК: 619:616.98:578.831.31:636.4:614.31(470)

РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ СВИНЕЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ РИСКА

А.С. Оганесян¹, М.А. Шибаяев², Н.Е. Баскакова³

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

² старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, shibaev@arriah.ru

³ юрист сектора анализа риска Информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, baskakova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В работе рассмотрен вопрос о применении стратегий борьбы против репродуктивно-респираторного синдрома свиней в условиях Российской Федерации. Рассмотрены биологические и правовые факторы, способные влиять на качество борьбы с ПРС. Рекомендованы разработка комплексного подхода при контроле, профилактике и диагностике ПРС и обновление государственного нормативно-правового регулирования по ПРС в РФ.

Ключевые слова: болезни свиней, репродуктивно-респираторный синдром свиней, вакцинация, ветеринарно-санитарные меры.

UDC 619:616.98:578.831.31:636.4:614.31(470)

PORCINE REPRODUCTORY AND RESPIRATORY SYNDROME IN THE RUSSIAN FEDERATION: CONTROL SYSTEMS, RISK IDENTIFICATION

A.S. Oganesyanyan¹, M.A. Shibayev², N.E. Baskakova³

¹ Head of the Sector, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: oganesyan@arriah.ru

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

³ Lawyer, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: baskakova@arriah.ru

SUMMARY

The paper deals with the issue of control strategies against porcine reproductive and respiratory syndrome in the Russian Federation. Biological and legal factors able to influence the quality of strategies applied in the RF are considered. It is recommended to develop a comprehensive approach to PRRS diagnostics, control and prevention for pig industry and update national PRRS legal and regulatory framework in the RF.

Key words: porcine diseases, porcine reproductive and respiratory syndrome, vaccination, animal health measures.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие свиноводства является необходимым и перспективным направлением для мясной отрасли в Российской Федерации (РФ). Производство вынуждено переключаться в интенсивные режимы биобезопасности, направленные на эффективное сохранение численности поголовья при достижении показателей объемов и сроков производства продукции. Значительная роль в этиологии смешанных болезней свиней отводится вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC). В поисках путей к решению проблемы контроля PPCC в стадах свиней многими исследователями уделяется пристальное внимание отдельным эпизоотологическим особенностям инфекции PPCC [25, 26, 41]. Поэтому актуальным представляется вопрос об идентификации основных биологических и правовых аспектов при применении различных схем контроля PPCC в условиях РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали традиционный метод анализа научных публикаций и документов с элементами контент-анализа в виде совокупности логических построений, направленных на раскрытие основного содержания. Идентификацию пробелов, присущих каждому из методов контроля PPCC, провели с использованием элементов качественной оценки [6]. Результаты представили в виде обсуждения и рекомендаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности эпизоотического процесса при PPCC. Возбудитель болезни — РНК-содержащий вирус рода *Arterivirus* (сем. *Arteriviridae*, порядок *Nidovirales*). Известно два генотипа вируса PPCC: американский и европейский (тип 1 и тип 2 соответственно). Оба типа способны продуцировать сходные клинические признаки, которые проявляются в виде репродуктивных поражений у взрослых свиней и гибель среди молод-

няка в результате тяжелой респираторной болезни [5, 49]. Болезнь имеет широкое распространение в мире (рис.).

При этом моноинфекция PPCC не способна вызвать тяжелые патологические проявления, что было показано экспериментально на SPF-поросятах. В промышленном свиноводстве PPCC приобретает вид субклинической инфекции, и вирус становится ко-фактором полиэтиологического синдрома, такого как респираторный симптомокомплекс. Ассоциации PPCC как с бактериальными, так и вирусными патогенами особенно выражены при респираторных формах болезни в группах доращивания [39, 42].

Отмечено вирусоносительство до 6 месяцев после инфицирования. Выделяется вирус с экскретами и секретами, в том числе и со спермой. Основными факторами распространения вируса PPCC между странами/хозяйствами выступают животные — носители вируса, контаминированная сперма хряков-носителей. Существует высокая вероятность аэрогенного пути распространения вируса PPCC между фермами [50, 58].

Попав в стадо, вирус PPCC способен поразить свиней во всех половозрастных группах. При этом характерно распространение при прямом контакте, аэрогенно, в результате использования контаминированного семени хряков и с фомитами. Возможность ятрогенной передачи вируса PPCC также не исключается [11, 57].

Вирус PPCC не является «персистирующим» вирусом в классическом понимании данного термина. Однако, учитывая технологические циклы большинства свиноводческих хозяйств, когда продолжительность времени до контакта с «новой» популяцией условно-инфицированного откормочного/ремонтного молодняка составляет около 180 дней, вирус может быть рассмотрен как патоген, пожизненно циркулирующий у свиней в технологическом цикле производства свинины. Отмечается, что за короткое время вирус PPCC охва-

тывает все поголовье фермы, и популяция становится эндемичной [52].

Острая фаза виремии длится около 28 дней, при этом клетками-мишенями являются альвеолярные макрофаги. Вирус может быть выделен из лимфатических узлов более чем через 100 дней после инфекции [19]. Ввиду того, что мишенью для вируса являются альвеолярные макрофаги свиней, репродукция вируса в макрофагах и клетках периферической крови ведет к первичной иммуносупрессии, увеличивая риск вторичной инфекции [16]. Системная продукция *интерлейкина-10* ведет к торможению иммунных реакций у свиней на другие антигены, воздействию которых они могут подвергаться в течение того же периода PPCC-инфекции. О негативных воздействиях PPCC-вирусной инфекции на эффективность вакцин сообщалось ранее [20, 22, 54], но прежде всего эффект иммуносупрессии вызывает опасения в отношении эффективности выработки иммунитета у свиней на вакцину против классической чумы свиней (КЧС) [46]. *Li u Yang (2003)* показано, что во время измерения специфических уровней *гамма-интерферона* к вирусу КЧС количество *интерлейкина-10* продуцирующих клеток в РВМС у PPCC-зараженных свиней было значительно увеличено в течение первых 14 дней после заражения. Системная продукция *интерлейкина-10* в момент вакцинации против КЧС у PPCC-инфицированных, вероятно, приводит к неудачной вакцинации [40].

При переболевании у свиней формируется постинфекционный гуморальный иммунитет, который сохраняется длительное время, однако наличие антител не является показателем надлежащей противовирусной защиты. Т-клетки не играют первостепенную роль при формировании иммунитета к PPCC. Особую роль в PPCC-иммунитете отводят комплексу: гамма-интерферону (клеточный) и вируснейтрализующим антителам (гуморальный). При этом считается, что при PPCC по отдельности ни один из видов иммунитета не является полностью эффективным, а существующие различия в Т-лимфоцитарных эпитопах между изолятами вируса PPCC европейского и американского генотипов провоцируют различия и по степени специфичности Т-лимфоцитарного ответа на действие вируса PPCC двух генотипов [25].

Таким образом, в ответ на инфекцию вирусом PPCC в стадах свиней у животных развивается гуморальный и клеточный ответ, роль которого в формировании устойчивости к заболеванию не до конца изучена (*так называемый «феномен иммунитета при PPCC»*), при этом признается негативный эффект инфицирования на успешность вакцинации против других патогенов. В настоящих условиях, при широком распространении вакцинации поголовья РФ против КЧС, PPCC-инфекция как фактор, влияющий на качество вакцинации против КЧС, должна изучаться и строго контролироваться.

Анализ данных официальной отчетности по эпизоотической ситуации по PPCC в РФ за последние годы (*по форме 1-вет ФГУ «Центр ветеринарии»*) показал, что в период с 2010 по 2015 гг. количество неблагополучных пунктов по данной болезни варьировало от 2 до 7 в год. В частности, в 2010 г. — 7 н.п. (заболело 785 голов), в 2011 г. — 3 н.п. (заболело 136 гол.), в 2012 г. — 6 н.п. (заболело 880 гол.), в 2013 г. — 2 н.п. (заболело 110 голов), в 2014 г. — 2 н.п. (заболело 17 голов) и за 2015 г. — 4 н.п. (заболело 7448 голов). При этом география ука-

занных неблагополучных пунктов довольно обширна (Курская, Свердловская, Амурская, Волгоградская, Брянская, Липецкая, Московская, Мурманская области, Приморский, Алтайский края, Удмуртская Республика, Республика Хакасия).

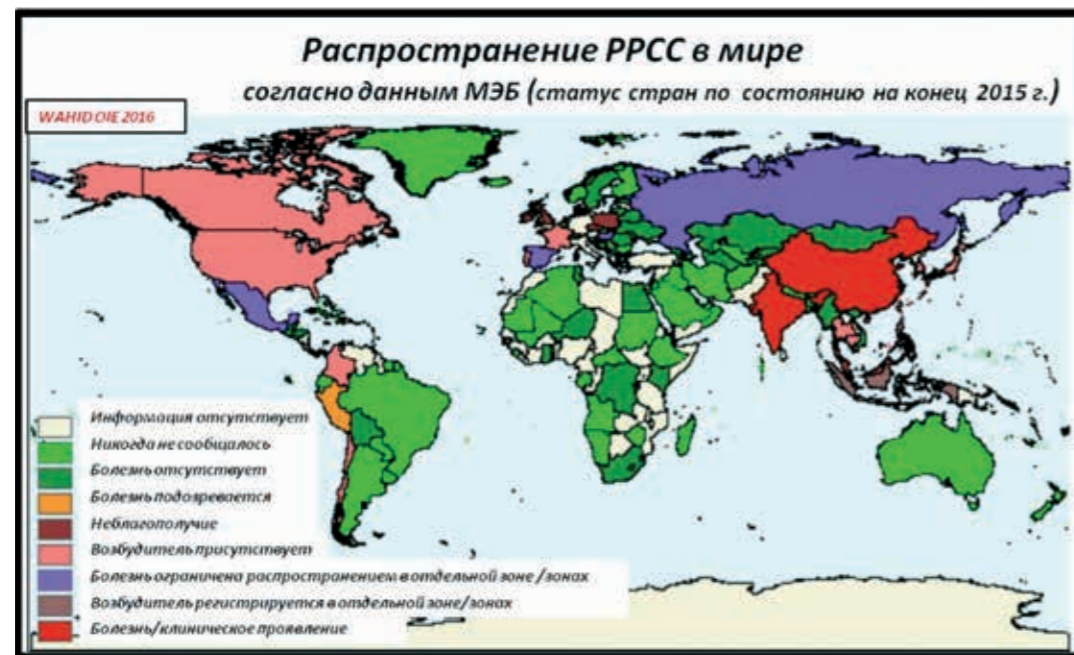
Исследования, проведенные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 1997–2005 гг., показывали широкое распространение PPCC на территории более 50 субъектов России. При этом доля сероположительных и неблагополучных по PPCC хозяйств с каждым годом снижалась: если в 1997 г. их было 80,2%, то в 2005 г. — только 56%. Тенденция снижения доли неблагополучных хозяйств может быть связана с рядом причин: увеличивающийся охват свиноголовья вакцинацией против PPCC, осуществление комплекса мероприятий, направленных на борьбу с «персистенцией» в неблагополучных хозяйствах [5]. Значительное количество серонегативных к PPCC хозяйств к 2007 г. было обусловлено массовым появлением новых производств, укомплектованных серонегативным к PPCC зарубежным поголовьем свиней и/или полной заменой поголовья на старых комплексах.

Филогенетический анализ российских изолятов PPCC, выделенных на территории РФ в 2009–2013 гг., проведенный *А.Д. Козловой с соавт. (2014)*, показал, что на территории РФ циркулируют варианты вируса PPCC, относящиеся к первому и второму субтипам европейского генотипа вируса PPCC. Ни одна из полученных последовательностей российских изолятов не попала в кластер лелистадподобных вирусов, который включает все вакцинные штаммы. Результаты свидетельствовали, что нуклеотидные последовательности полевых изолятов отличаются от таковых штаммов, входящих в состав отечественных и зарубежных вакцин, применяемых для профилактики PPCC на территории нашей страны [8].

С другой стороны, в некоторых отечественных хозяйствах был выделен вирус PPCC и американской генотипы. В частности, в 2007 г. в Иркутской области была зарегистрирована первая на территории России вспышка атипичного PPCC, вызванная высоковирулентным изолятом вируса PPCC американского генотипа. Результаты исследований, проведенных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2012 г., показывают, что при респираторной патологии свиней геном возбудителя PPCC выявляли в 20% случаев, а при репродуктивной патологии — в 7% случаев. При этом генотипирование выявленных изолятов показало, что только 97% изолятов принадлежали к европейскому генотипу, а 3% — изоляты, принадлежащие к американской генотипу. *Зеленуха Е.А. (2012)*, проводя полевые исследования в условиях промышленного свинокомплекса в 2009 г., сообщает о выделении из внутренних органов 50–60-дневных поросят PPCC европейского и американского генотипов. При этом в группе абортировавших свиноматок, при отсутствии вакцинации, выявлен прирост титра антител как к европейскому, так и к американскому типам вируса.

Таким образом, PPCC имеет широкое распространение в поголовье свиней РФ и остается одной из актуальных проблем для отечественного свиноводства. Большинство исследований сообщает о присутствии в популяции РФ вируса PPCC европейского генотипа, который по всей вероятности является преобладающим, однако циркуляцию американского генотипа вируса и их комбинаций исключать нельзя [2, 8].

Рис. Распространение PPCC в мире согласно данным МЭБ (2015 г.)



Существующие стратегии контроля и профилактики РРСС. Для управления РРСС применяется ряд подходов, которые концептуально можно свести к 2 следующим стратегиям [17]: 1. стратегия, основанная на менеджменте стада (создание SPF-стад), и 2. стратегия, основанная на создании группового иммунитета.

Стратегия, основанная на менеджменте стада (создание SPF-стад), направлена на поддержание таких режимов биологической безопасности, при которых циркуляция вируса РРСС в стадах представляется невозможной. Статус животных в отношении РРСС при этом становится равноценным SPF-статусу в отношении РРСС-вируса. И может выражаться в виде депопуляции поголовья с последующей репопуляцией предприятия и менеджментом по закрытому типу; введении системы биобезопасности с прицелом на РРСС; управлении, основанном на разделении групп животных, тестировании и выбраковке инфицированных. При создании SPF-стада наибольшее внимание уделяют чистоте генетического источника при замене инфицированного поголовья (маточник и сперма), налаживанию работы отделений в режимах «пусто-занято», внедрению систем биобезопасности (в т.ч. с применением систем фильтрации воздуха, мониторинга/тестирования и т.д.) с введением протоколов биобезопасности [52].

Стоит отметить, что затраты, связанные с созданием SPF-стад, порой достаточно велики и в основном связаны не только с единовременными расходами на замену поголовья, но и с постоянными плановыми расходами, направленными на поддержание эффективности работы систем биобезопасности и лабораторного контроля [24]. Выгода от создания SPF-стад наиболее очевидна для крупных племенных (маточных) репродукторов. В отношении товарных ферм и мелких хозяйств экономическая выгода от введения подобной системы в условиях эндемичности по РРСС сомнительна.

Стратегия, основанная на создании группового иммунитета, включает превентивную вакцинацию всего поголовья или отдельных групп и превентивную инокуляцию местным штаммом РРСС (перезаражение).

Перезаражение. Рядом зарубежных авторов рекомендуется в качестве одного из средств борьбы с заболеваемостью РРСС на свинофермах в условиях производственного потока и носит название «акклиматизация». При этом рекомендуется принять ряд дополнительных мер для строгой последовательности и непересекаемости производственного потока [13, 18] с целью недопущения обратного заноса вируса РРСС, циркулирующего в группах доразивания и откорма, в маточное поголовье, а также с целью снижения риска появления генетических реассортантов вируса РРСС. Достигается это путем реализации мер биологической безопасности и делением «акклиматизации» к вирусу РРСС на три последовательных этапа: 1. доэкспозиционный период (определяется статус вводимого в стадо животного по РРСС); 2. экспозиционный период (непосредственного контакта вируса и животного); 3. постэкспозиционный период (период подтверждения отсутствия активного выделения вируса от животного, вводимого в стадо или группу). Недостатками метода «акклиматизации» являются: высокая вероятность циркуляции различных штаммов РРСС в различных по возрасту группам на территории одного предприятия; вероятность зарождения новых реассортантов

РРСС; необходимость постоянного филогенетического мониторинга штаммов, циркулирующих в хозяйстве, направленного на выявление реассортантов; необходимость введения более строгой системы мер биобезопасности, направленных на прерывание любых косвенных контактов субпопуляций животных внутри хозяйства.

Вакцинация. Используется с целью уменьшения потерь от клинических случаев РРСС, но она не эффективна в отношении предотвращения заражения животных вирусом РРСС (инфекции) [15]. Стратегия вакцинации сопряжена с более низкими расходами и с легкостью осуществима в различных категориях хозяйств по сравнению с другими стратегиями управления РРСС [52].

Практика вакцинопрофилактики РРСС предусматривает использование двух типов РРСС-вакцин: вакцины, содержащие модифицированный живой вирус РРСС (MLV-вакцины); вакцины, содержащие убитый вирус (инактивированные вакцины) [15, 36]. В настоящее время разработаны и коммерчески доступны оба типа вакцин: инактивированные, полученные на основе штаммов P120, VD-E1, VD-E2, VD-A1 и 5710, и модифицированные живые вакцины, полученные на основе штаммов VP-046-BIS, All-183 и DV [47].

MLV-вакцины против РРСС широко применяются в ряде стран мира с развитым свиноводством. Лицензированные для использования в США являются производными от американского типа РРСС, включают *Ingelvac[®] PRRS MLV* и *ReproCyc[®] PRRS-PLE* (шт. VR-2332; *Boehringer Ingelheim*) и *Ingelvac[®] PRRS ATP* (шт. JA-142; *Boehringer Ingelheim*). В странах ЕС вакцины происходят только из европейского типа вируса РРСС и включают *Porcilis PRRS[®]* (шт. DV; *Merck*), *Amervac-PPCC[®]* (шт. VP-046; *Hipra*) и *Pyrsvac-183[®]* (шт. All-183; *Syva*). MLV-вакцины, лицензированные в других странах, могут не ограничиваться одним генотипом вируса [34]. MLV-вакцины против РРСС хорошо известны своей защитной эффективностью против полевого вируса РРСС, но только генетически гомологичного вакцинному, в то же время существует некоторая озабоченность в отношении иммуногенности, перекрестной защитной эффективности и безопасности таких вакцин в отношении гетерологических штаммов [10, 12].

Так, *Kiss I. с соавт. (2006)* сообщали о серии вспышек РРСС на фермах, где генетическая структура вирусов РРСС существенно изменилась после использования 2 живых вакцин. Увеличилось число абортос, мертворождаемости, возросла смертность поросят до 10%. Филогенетический анализ изолята показал, что оболочка, кодирующая оболочечный гликопротеин GP5 и нуклеокапсидный белок вируса, имеет тесное генетическое родство с вакцинной. Авторами заключается, что реверсия вакцинных штаммов в сторону полевого типа или рекомбинации возможны. При этом использование MLV-вакцин против гетерологических штаммов вируса способствует этому [30].

С другой стороны, массовая MLV-вакцинация в опытных условиях значительно сокращает количество персистентно-инфицированных свиней к 123 дню. Вакцинация полностью не устраняла циркуляцию полевого вируса РРСС, но введение 2 и 3 доз MLV-вакцины снижало выделение вируса от животных на 97 день после инфекции. Предварительное воздействие полевым вирусом и вакциной снижало вероятность клинических признаков и усиливало ответ к последующему гетеро-

логичному штамму вируса, но не предотвращало инфицирования животных. Следовательно, терапевтическое действие MLV-вакцинации, вероятно, снижает потери, вызванные гетерологическим РРСС, но не предотвращает циркуляции [21].

Таким образом, протективная эффективность MLV-вакцин заключается в предотвращении развития клинических признаков у поросят и предотвращении вирусемии у свиноматок. В эндемичных стадах и при вспышке применение вакцинации также вызывает сокращение репродуктивных и респираторных проявлений болезни в соответствующих группах свиней [32, 36, 37].

Как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ на вакцины, содержащие как европейский, так и американский типы вируса, достаточно слабо выражен. Антитела на N-гликопротеин вырабатываются уже на 2 неделе после вакцинации, однако они не обладают вируснейтрализующими свойствами. К 4 неделе после вакцинации РРСС вырабатываются вируснейтрализующие антитела, но в очень низком титре. Выработка гамма-интерферона при клеточном иммунитете в ответ на вакцинацию проявляется на 2–4 неделе, постепенно увеличивается с возрастом и достигает максимума примерно на 32 неделе после вакцинации. Важно помнить, что иммунитет при РРСС-вакцинации на сегодняшний день полностью не изучен, а по мнению ряда исследователей, является «феноменом», требующим глубокого изучения [14, 31, 32, 35, 38]. Дело в том, что у MLV-вакцинированных поросят не происходит анамнестического гуморального и клеточного ответа на заражение гомологичным полевым вирусом РРСС или при ревакцинации. С другой стороны, при заражении гетерологическим вирусом РРСС и клеточный, и гуморальный ответ у MLV-вакцинированных проявляется в виде анамнестического [23, 38, 51].

Вероятно, с этим связаны и недостатки MLV-вакцинации, по поводу которых имеются опасения:

- отсроченность наступления защиты при MLV-вакцинации (3–4 недели);
- отмечающаяся генотипо- и в большей степени штаммоспецифичность вакцинной защиты;
- иммунизация MLV-вакциной может снижать защитную эффективность других вакцин (например, вакцинации против классической чумы, псевдобешенства или *Mycoplasma hyopneumoniae*) [44];
- вероятность реверсии вирулентных свойств вакцинных штаммов. Это связывают с вероятными генетическими мутациями вируса, вызванными пассажами через чувствительные организмы и/или вероятностью рекомбинации с полевыми вирулентными штаммами РРСС [53, 55, 56].

Однако стоит признать, что до настоящего времени нет сообщений о негативном влиянии MLV-вакцин на здоровье свиней в полевых условиях при применении против гомологичных штаммов, а эффект MLV-вакцинации против гетерологических вирусов РРСС рассматривается как преимущество.

Инактивированные вакцины против РРСС. Лицензированы для применения на территории многих стран, за исключением США. Выпускаются как зарубежными (*Boehringer Ingelheim*, *Hipra*, *Merial*, *Dyntec* и др.), так и отечественными производителями (НПО «НАРВАК» и ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Считается, что инактивированные вакцины более безопасны, но в полевых условиях менее эффективны,

нежели MLV-вакцины [46]. В отличие от MLV-вакцин, инактивированные вакцины не вызывают выработку антител (которые могут быть обнаружены коммерческими диагностическими наборами), а клеточный иммунитет при этом очень слабо выражен как при заражении гомологичным, так и при заражении гетерологичным полевым вирусом РРСС. В случае применения инактивированной вакцины на РРСС-позитивных животных вакцина усиливает гуморальный и клеточный иммунитет. Иммунный ответ увеличивается приблизительно в течение 2 недель после ревакцинации и коррелирует с защитой. Этот феномен позволяет использовать инактивированные вакцины в качестве терапевтических в неблагополучных (позитивных) стадах [15, 48]. У иммунологически наивных животных вакцина не в состоянии предотвратить репродуктивные потери и врожденную инфекцию у плодов. При использовании среди поросят групп доразивания и хряков вакцина не в состоянии уменьшить вирусемии, выделение вируса со спермой и признаки респираторных поражений при инфицировании вирулентными штаммами РРСС [28, 12].

Преимущества применения инактивированной вакцины очевидны для пораженных стад. В этих случаях вакцина помогает увеличить эффективность опоросов и сохранить число жизнеспособных отъемышей. Наибольшим преимуществом инактивированных вакцин является их теоретическая полная безопасность. До настоящего времени нет ни одного сообщения об их негативном влиянии на здоровье свиней.

Выявление пробелов, присущих каждой из стратегий контроля РРСС для РФ. Каждой из стратегий борьбы и контроля РРСС присущи как достоинства, так и недостатки. Выбор наиболее приемлемого метода контроля в условиях РФ требует прояснения ввиду большой значимости РРСС для свинопроизводства. Комплектование качественных племенных стад продолжает зависеть от импорта не только ввиду генетических выгод, но и в силу уменьшения эпизоотических рисков. Однако следствием обширной географии импорта живых животных и генетического материала (как в прошлом, так и в настоящем) может явиться то, что в пределах одного региона или даже хозяйства могут циркулировать генетически различные штаммы вируса РРСС.

Учитывая сложившуюся эндемичность популяции свиней РФ по РРСС, а также факты выявления вируса как европейской, так и американской генотипов вируса РРСС, следует рассмотреть несколько критериев, ассоциирующихся с пробелами использования того или иного метода борьбы с РРСС на территории РФ.

Отдельные внутрихозяйственные программы борьбы с РРСС характеризуются по большей части разобщенностью, неоднородностью или заимствованы за рубежом (т.е. разрабатывались с учетом условий, отличных от условий РФ, в т.ч. в эпизоотологических, административных и правовых вопросах). В целом российскими практиками признается, что контроль РРСС на предприятиях с использованием вакцин является достаточной и приемлемой мерой для управления эпизоотическим процессом. В хозяйствах проводятся широкие вакцинальные кампании, направленные на борьбу с РРСС.

На сегодня на территории РФ действующей инструкцией по борьбе с РРСС («Временная инструкция по профилактике и борьбе с репродуктивно-респираторно-

Таблица
Стратегии контроля РРСС: сильные и слабые стороны

	Преимущества	Недостатки	Комментарий
Создание SPF-стада	- высокая эффективность для племенных стад; - риск явиться источником вируса РРСС устранен полностью.	- требует затрат на биобезопасность и ее контроль (в т.ч. карантинные издержки и поиск SPF-источников комплектования стад); - требует колоссальных затрат на замену поголовья; - в случае проникновения патогена в стадо программа не предусматривает гибкости.	Создание SPF-стада должно интересоваться в первую очередь производителя/хозяина. В основе заинтересованности в создании такого стада должны иметься преференциальные стимулы со стороны государства/системы. Должен иметься «экономический» механизм поддержки (субсидирование/поддержка таких хозяйств) или нетарифный механизм (разрешение перемещения порослят из таких хозяйств в любой регион РФ/ТС).
Перезаражение/акклиматизация	- высокая эффективность для групп доращивания и откорма; - отсутствие дополнительных затрат на биобезопасность.	- риск явиться источником вируса для свободных хозяйств; - риск обратного заноса вируса и реассортации; - требует дополнительных затрат на биобезопасность и контроль производственного потока.	Данный подход подходит в наибольшей степени для хозяйств, производящих товарных/убойных свиней. При этом масштабы производства ограничены в силу использования собственных источников поголовья порослят доращивания и откорма. Стратегия акклиматизации может существовать на уровне отдельных компартментов или территорий. Использование ее отдельными производителями в регионе, проводящем иную политику по РРСС, чревато для производителей явиться источником РРСС для остальных. Сложность состоит еще и в том, что в случае признания фермы очагом перегруппировка животных запрещена.
Вакцинация (MLV и/или инактивированные)	- эффективность для различных половозрастных групп; - доступность; - отсутствие дополнительных затрат на биобезопасность.	- требует дополнительных затрат на контроль производственного потока; - прямые издержки, связанные с вакцинацией и мониторингом; - требует гармонизации календаря вакцинации в производственном потоке.	Выбор стратегии вакцинопрофилактики в настоящее время попадает в сферу ответственности и компетенции отдельного хозяина. Следует учесть и тот факт, что поствакцинальный иммунитет при РРСС остается «феноменом».
Системный подход	- высокая эффективность; - вовлечение инструментов понимания производственного потока; - вовлечение элементов множественного управления; - возможность коррекции в режиме реального времени.	- требует дополнительных затрат на контроль производственного потока; - прямые издержки, связанные с вакцинацией; - требует качественной лабораторной диагностики в плане как первичной идентификации, так и последующего контроля.	Данная стратегия признает контроль РРСС не просто как вакцинацию, а обращает большое внимание на использование системного подхода с вовлечением инструментов понимания производственного потока, элементов множественного управления. И наиболее, на наш взгляд, значимое место в этой системе уделяется использованию мониторинга статуса поголовья свиней в отношении РРСС, основанного на качественной лабораторной диагностике с привлечением серологических и молекулярно-биологических методов.

торым синдромом свиней», утверждена 02.03.1994 г.) при выявлении РРСС на ферме такого метода борьбы и контроля, как вакцинация, не предусмотрено [1]. Между тем на территории РФ вакцины против РРСС регистрировались и применялись все эти годы. В настоящее время зарегистрированы инактивированные вакцины против РРСС и две MLV-вакцины: АМЕРВАК-PRRS (Amervac® PRRS) — Laboratorios Hipra, Spain (штамм VP046-BIS, Хипра, Испания) и Porcilis PRRS® (штамм DV, Интервет Интернешнл, Нидерланды). Причем порядок применения MLV-вакцин на территории РФ ограничивается лишь инструкциями по их применению, которые не согласуются с рекомендациями МЭБ для живых MLV-вакцин [45]. При этом стоит отметить, что информация по применению Porcilis PRRS®, отраженная на официальном английском сайте производителя вакцины, отличается от таковой на официальном рус-

ском сайте, она шире и содержит ряд принципиальных и важных моментов, в частности: использование данной MLV-вакцины должно проводиться после установления циркуляции в стаде вируса РРСС европейского генотипа; использование MLV-вакцины должно проводиться после определения статуса свинофермы в отношении РРСС во избежание проникновения вакцинного штамма РРСС в области, где РРСС уже не циркулирует; не рекомендовано использовать сперму, полученную от вакцинированных хряков, в серонегативных стадах ввиду того, что вирус может долгое время выделяться со спермой; не рекомендовано использовать вакцину в стадах, где методы борьбы основаны на серологическом тестировании и выбраковке животных.

В отношении рекомендации по применению другой живой MLV-вакцины (АМЕРВАК-PRRS) в РФ в инструкции по применению вообще не указаны порядки при-

менения на супоросных свиноматках и использования спермы от вакцинированных хряков. В отношении относительно нового продукта, MLV-вакцины *Fostera*™ PRRS (Pfizer Inc.) также в качестве мер предосторожности предписано не использовать на супоросных свиноматках и племенных хряках. При этом признается, что вакцинный вирус может распространяться при прямом и непрямом контакте с вакцинированным животным [29].

На сегодня, в качестве примера общепризнанных научно-практических рекомендаций контроля и элиминации РРСС на предприятиях свиноводства, нельзя не упомянуть о разработанном системном подходе по управлению РРСС «PRRS 5-Step Process» [http://www.prrs.com/en]. Стоит особо отметить, что данная программа признает контроль РРСС не просто как вакцинацию, а обращает большое внимание на использование системного подхода с вовлечением инструментов понимания производственного потока, элементов множественного управления. И наиболее, на наш взгляд, значимое место в системах менеджмента стад уделяется лабораторной диагностике в плане первичной идентификации и последующего контроля статуса поголовья свиней в отношении РРСС, что рекомендуется *American Association of Swine Veterinarians* [9].

Преимущества и недостатки основных стратегий по РРСС сведены в таблице, также представлены комментарии.

Таким образом, по наиболее распространенной на сегодня стратегии вакцинации можно отметить, что применение MLV-вакцин требует строгого внутрихозяйственного ветеринарного контроля и соблюдения технологических потоков. Учитывая то, что лабораторная диагностика РРСС в РФ не обязывает собственников хозяйств проводить генотипирование выявляемых циркулирующих изолятов РРСС, а зачастую проводится с использованием только серологических методов, создается ситуация недооценки эпизоотической картины по РРСС в регионах РФ в целом и в отдельных хозяйствах в частности. Только на основе объективной оценки эпизоотической ситуации можно эффективно выбрать стратегию борьбы с РРСС с использованием вакцинации. Это связано с тем, что определенный тип вакцин, как отмечалось выше, имеет большую эффективность в отношении гомологичного генотипа и штамма циркулирующих вирусов РРСС. Иными словами, наиболее безболезненным и эффективным в реальных условиях будет переход к стратегии системного подхода. Однако применение данной стратегии в РФ на сегодня, к сожалению, может быть ограничено в силу отсутствия широкой сети диагностических лабораторий, способных вести качественный серологический мониторинг и генотипирование штаммов РРСС.

Положительными факторами, способными повлиять на ситуацию, могут явиться обновление нормативно-правового регулирования при борьбе с РРСС, обсуждение проблем стратегий борьбы с РРСС и обмен опытом о результатах применения различных стратегий для различных типов свиноводческих хозяйств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцины (MLV-вакцины или инактивированные вакцины) в целом не являются панацеей для обеспечения защиты животных против инфекции вирусом РРСС. Стратегия борьбы с РРСС в конкретных стадах должна

учитывать технологические особенности свиноводческого производства и необходимость комплексного подхода при обязательном использовании имеющегося спектра профилактических и диагностических средств.

Высокая эффективность MLV-вакцин сопряжена с более высокими требованиями по контролю их применения, построения надежного календаря вакцинации конкретного производства и необходимости мониторинга РРСС в разных половозрастных группах. Высокая безопасность и терапевтический эффект инактивированных вакцин в то же время сопряжены с более низкой эффективностью.

В качестве пробелов контроля РРСС в стадах РФ отмечается:

- необходимость обновления нормативно-правового регулирования борьбы и профилактики РРСС в РФ. Отсутствует комплексный подход контроля/искоренения РРСС внутри различных типов свиноводческих хозяйств;
- отсутствие качественного мониторинга РРСС в стадах;
- РРСС-инфекция и вакцинация как фактор влияния на качество КЧС-вакцинации изучены неполно в полевых условиях РФ.

Учитывая значимость РРСС для свиноводческой отрасли, возможным выходом из сложившейся ситуации может явиться разработка комплексного подхода для диагностики, контроля и профилактики РРСС в промышленном свиноводстве и обновление официального нормативно-правового регулирования по РРСС с учетом научно-практических рекомендаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Временная инструкция по профилактике и борьбе с репродуктивно-респираторным синдромом свиней: 19-4-2/46, утверждена Департаментом ветеринарии 02.03.1994 г. — 9 с.
2. Генетическое разнообразие вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней / А.В. Щербаков [и др.] // Акт. пробл. инф. пат. жив.: материалы Междунар. науч. конф., Владимир, 30–31 окт. 2003 г. — С. 150–155.
3. Изучение комплекса респираторных болезней свиней в свиноводческих хозяйствах России / С.А. Кукушкин [и др.] // Росс. вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. — 2008, сент. (спец. вып.). — С. 55–57.
4. Комплекс респираторных болезней свиней: факторный анализ и первичная модель заболевания / А.С. Оганесян [и др.] // Вет. патология. — 2009. — № 4. — С. 28–38.
5. Кукушкин, С.А. Эпизоотология и меры борьбы с РРСС в мире и РФ / С.А. Кукушкин // Вет. патология. — 2006. — №4 — С. 89–95.
6. Методические указания по идентификации, анализу и управлению рисками при импортно-экспортных мероприятиях с животными и продукцией животного происхождения / А.С. Оганесян [и др.] // Владимир, 2013, ФГБУ «ВНИИЗЖ». — 118 с.
7. Орлянкин Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней // Актуальн. пробл. инфекц. патологии и иммунологии животных: Материалы междунар. науч.-практ. конф.: — М., 2006. — С. 135–139.
8. Филогенетический анализ изолятов вируса РРСС, выделенных на территории РФ в 2009–2013 гг.

- / А.Д. Козлова [и др.] // Ветеринария. — 2014. — № 9. — С. 22–25.
9. AASV PRRS Biosecurity Manual. — Andrea Pitkin [et al.] — CVM URL: https://www.aasv.org/aasv/PRRSV_BiosecurityManual.pdf.
10. Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. / D.L. Foss, M.J. Zilliox, W.A. Meier [et al.] // *Viral Immunol.* — 2002. — Vol. 15, Iss.4. — P. 557–566.
11. Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview / E. Albina // *Vet. Microb.* — 1997. — Vol. 55, Iss. 1–4. — P. 309–316.
12. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. / F.A. Zuckermann [et al.] // *Vet. Microb.* — 2007. — Vol. 123. — P. 69–85.
13. Batista L. Experimental injection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization. / L. Batista, C. Pijoan, M. Torremorell // *J. Swine Health Prod.* — 2002. — Vol. 10, Iss.4. — P. 147–150.
14. Charentantanakul W. Biology of porcine T lymphocytes. / W. Charentantanakul, J.A. Roth // *Anim. Health. Res. Rev.* — 2006. — N.7. — P. 81–96.
15. Charentantanakul W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: immunogenicity, efficacy and safety aspects / W. Charentantanakul // *World J. Virol.* — 2012. — Vol. 1 (1). — P. 23–30.
16. Chen Huang. Regulation and evasion of antiviral immune responses by porcine reproductive and respiratory syndrome virus / Chen Huang, Qiong Zhang, Wen-hai Feng // *Vir. Res.* — 2015. — Vol. 202. — P. 101–111.
17. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / Corzo C.A. [et al.] // *Virus Res.* — 2010. — Vol. 154. — P. 185–192.
18. Dee S. Controlling the spread of PRRS virus in the breeding herd through management of the gilt pool. / S. Dee, H.S. Joo, C. Pijoan // *J Swine Health Prod.* — 1995. — Vol. 3, № 2. — P. 64–69.
19. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. / R.W. Wills [et al.] // *J. Clin. Microb.* — 2003. — Vol. 41, Iss.1. — P. 58–62.
20. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae* / E.L. Thacker [et al.] // *Vaccine.* — 2000. — Vol. 18. — P. 1244–1252.
21. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs / J.P. Cano, S.A. Dee, M.P. Murtaugh, C.A. Trincado, C.B. Pijoan // *Am. J. of Vet. Res.* — 2007. — Vol. 68, № 5. — P. 565–571.
22. Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. / M.G.M. De Bruin [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* — 2000. — Vol. 76. — P. 125–135.
23. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. / P. Martelli, S. Gozio, L. Ferrari [et al.] // *Vaccine.* — 2009. — Vol. 27. — P. 3788–3799.
24. Emergence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Sweden: Detection, Response and Eradication / U. Carlsson, P. Wallgren, L.H. M. Renstrom [et al.] // *Transbound. & Emerging Diseases.* — 2009. — Vol. 56, № 4. — P. 121–131.
25. European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells / E. Silva-Campa [et al.] // *Virology.* — 2010. — Vol. 396. — P. 264–271.
26. Evaluating perspectives for PRRS virus elimination from pig dense areas with a risk factor based herd index / A.S. Fahrion [et al.] // *Prev. Vet. Med.* — 2014. — Vol. 114, Iss. 3–4. — P. 247–258.
27. Experimental airborne transmission of PRRS virus. / C.S. Kristensen [et al.] // *Vet. Microb.* — 2004. — Vol. 99, Iss. 3–4. — P. 197–202.
28. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. / M. Scotti [et al.] // *Vet. Rec.* — 2007. — Vol. 161. — P. 809–813.
29. Foster PRRS Product Information Sheet. — URL: https://www.zoetisus.com/products/pages/fosterprprs/documents/FosterPRRS_UpdatedProductSheet_24W_FINAL.PDF.
30. Genetic variation of the prevailing porcine reproductive and respiratory syndrome viruses occurring on a pig farm upon vaccination / I. Kiss, L. Sami, S. Kecskemeti, K. Hanada // *Arch. of Virol.* — 2006; Vol. 151, № 11. — P. 2269–2276.
31. Gerner W. Porcine T lymphocytes and NK cells—an update / W. Gerner, T. Käser, A. Saalmüller // *Dev. Comp. Immunol.* — 2009. — № 33. — P. 310–320.
32. Gillespie T.G. Methods of control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using modified live vaccine in a two-site production system / T.G. Gillespie, A.L. Carroll // *J. Swine Health Prod.* — 2003 — Vol. 11, № 6. — P. 291–295.
33. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. / W.A. Meier, J. Galeota, F.A. Osorio [et al.] // *Virology.* — 2003. — Vol. 309. — P. 18–31.
34. http://www.cfsph.iastate.edu/Vaccines/manufacture_list.php
35. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus / W. Charentantanakul, R. Platt, W. Johnson [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* — 2006. — Vol. 109. — P. 99–115.
36. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / M.P. Murtaugh, Z. Xiao, F. Zuckermann [et al.] // *Viral Immunol.* — 2002. — Vol. 15, Iss. 4. — P. 533–547.
37. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory virus vaccine intervention on a population of pigs infected with heterologous isolate / J.P. Cano, S.A. Dee, M.P. Murtaugh, C. Pijoan // *Vaccine.* — 2007. — Vol. 25, Iss. 22. — P. 4382–4391.
38. Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8+ T cells / J. Bassaganya-Riera, B.J. Thacker, S. Yu [et al.] // *Viral Immunol.* — 2004. — Vol. 17. — P. 25–37.

39. Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* / R. Thanawongnuwech, B. Thacker, P. Halbur, E.L. Thacker // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2004. — Vol. 11, № 5. — P. 901–908.
40. Li H. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination / H. Li, H. Yang // *Vet. Microbiol.* — 2003. — Vol. 95. — P. 295–301.
41. Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. / V.G. Papatsiros, C. Alexopoulos, S.K. Kritas [et al.] // *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* — 2006. — Vol. 53. — P. 266–272.
42. Martínez-Lobo F.J. Safety of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Modified Live Virus (MLV) vaccine strains in a young pig infection model / F.J. Martínez-Lobo, L. Carrascosa de Lome, F. Díez-Fuertes // *Vet. Res.* — 2013. — Vol. 44. — P. 115.
43. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia / E.L. Thacker, P.G. Halbur, R.F. Ross [et al.] // *J. Clin. Microb.* — 1999. — Vol. 37, № 3. — P. 620–627.
44. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine / S. Suradhat, S. Kesdangsakonwut, W. Sada [et al.] // *Vaccine.* — 2006. — Vol. 24, Iss. 14. — P. 2634–2642.
45. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014 Chapter 2.8.7 Porcine reproductive and respiratory syndrome. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.07_PRRS.pdf.
46. Papatsiros V.G. Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus Vaccinology: a Review for Commercial Vaccines-2013. — <http://en.engormix.com/MA-pig-industry/health/articles/porcine-respiratory-reproductive-syndrome-t2528/165-p0.htm>.
47. Papatsiros V.G. Porcine respiratory and reproductive syndrome virus vaccinology: a review for commercial vaccines / V.G. Papatsiros // *Am. J. Animal Vet. Scien.* — 2012. — Vol. 7, № 4. — P. 149–158.
48. Performance of Fattening Pigs in a Farm Infected with Both Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus and Porcine Circovirus Type 2 Following Sow and Piglet Vaccination with an Attenuated PRRS Vaccine / S.K. Kritas, C. Alexopoulos, C.S. Kyriakis [et al.] // *J. Vet. Med. (Ser. A).* — 2007. — Vol. 54, № 5. — P. 287–291.
49. Polymicrobial Diseases — Edited by Brogden K.A. & Guthmiller J.M.- Washington (DC): ASM Press; 2002. — ISBN-10: 1-55581244-9. — URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/>.
50. Preliminary assessment of an inactivated PRRS virus vaccine on the excretion of virus in semen / S.L. Swenson [et al.] // *J. Swine Health Prod.* — 1995. — Vol. 3, № 6. — P. 244–247.
51. Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain / P. Martelli, P. Cordioli, L.G. Alborali [et al.] // *Vaccine.* — 2007. — Vol. 25. — P. 3400–3408.
52. PRRS Control And Elimination Toolkit. Version 2. — OSHAB OPIC, Canada. — 2011. — 29 p. — URL: <http://prrsarce.ca/7B1C8983-4524-427B-AC9C-0DFB0ABCAC7E/FinalDownload/DownloadId-B076951C99355886E1334AF38567951D/7B1C8983-4524-427B-AC9C-0DFB0ABCAC7E/storage/documents/OSHAB%20PRRS%20Tool%20kit%20Final%202011.pdf>.
53. Rowland R.R. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. / R.R. Rowland // *Vir. Res.* — 2010. — Vol. 154. — P. 114–122.
54. Suradhat S. Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas / S. Suradhat, S. Damrongwatanapokin, R. Thanawongnuwech // *Vet. Microb.* — 2007. — Vol. 119. — P. 1–9.
55. Thanawongnuwech R. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design / R. Thanawongnuwech, S. Suradhat // *Vir. Res.* — 2010. — Vol. 154. — P. 133–140.
56. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / M.P. Murtaugh [et al.] // *Vir. Res.* — 2010. — Vol. 154. — P. 18–30.
57. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles / S. Otake, S.A. Dee, K.D. Rossow [et al.] // *Vet. Rec.* — 2002. — Vol. 150, Iss. 4. — P. 114–115.
58. Use of a production region model to evaluate biosecurity protocol efficacy for reducing the risk of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* spread between farms: June 16, 2010 / University of Minnesota; Scott Dee. — USA, Minnesota, 2010. — 13 p. — №: NPB #07-110 & 09-152*.

UDC 619:639.3.091:615.371

VACCINE OIL ADJUVANTS FOR THE DEVELOPMENT OF AQUACULTURE

J.B. Arous¹, L. Dupuis²

¹ PhD, Innovation and Development Manager – Galenic and Vaccines Applications, SEPPIC, France, e-mail Juliette.BENAROUS@airliquide.com

² PhD, Animal Health Activity Director, SEPPIC, France, e-mail: laurent.dupuis@airliquide.com

SUMMARY

Aquaculture is a fast growing industry, which produces today more than 30 species of fish. The growth of aquaculture in the last decades has been supported by the development of oil adjuvanted injectable vaccines that allowed a long term protection of fish and a strong reduction of the use of antibiotics. Today, injectable vaccines for fish are administered through intraperitoneal injection and are usually adjuvanted with water in oil emulsion adjuvants. Montanide™ ISA 763A VG is a non mineral oil based adjuvant which has been extensively used for vaccination of diverse fish species (salmon, trout, seabass, tilapia, ect.). Other routes of administration such as immersion and oral administration are also considered and new adjuvants and formulations are being developed for these applications.

Key words: Fish vaccines, aquaculture, adjuvants, Montanide™.

УДК 619:639.3.091:615.371

ВАКЦИННЫЕ МАСЛЯНЫЕ АДЪЮВАНТЫ ДЛЯ РАЗВИТИЯ АКВАКУЛЬТУРЫ

J.B. Arous¹, L. Dupuis²

¹ PhD, Innovation and Development Manager – Galenic and Vaccines Applications, SEPPIC, France, e-mail Juliette.BENAROUS@airliquide.com

² PhD, Animal Health Activity Director, SEPPIC, France, e-mail: laurent.dupuis@airliquide.com

РЕЗЮМЕ

Сельское хозяйство является быстроразвивающейся отраслью, которая на сегодняшний день производит более 30 видов рыб. Развитию аквакультурной отрасли в течение последних десятилетий способствовала разработка инъекционных вакцин на основе масляного адъюванта, что позволило обеспечить длительную защиту рыб и значительно снизить использование антибиотиков. Сегодня инъекционные вакцины для рыб вводятся внутривнутрино, и в них обычно добавляется масляный адъювант для эмульсионных вакцин. Montanide™ ISA 763A VG является адъювантом без минерального масла, который широко использовался для вакцинации разнообразных видов рыб (лосось, форель, сибас, тилапия и т.д.). Также рассматриваются другие способы введения вакцины, такие как погружение или пероральное введение. Для этого разрабатываются новые адъюванты и составы.

Ключевые слова: вакцины для рыб, аквакультура, адъюванты, Montanide™.

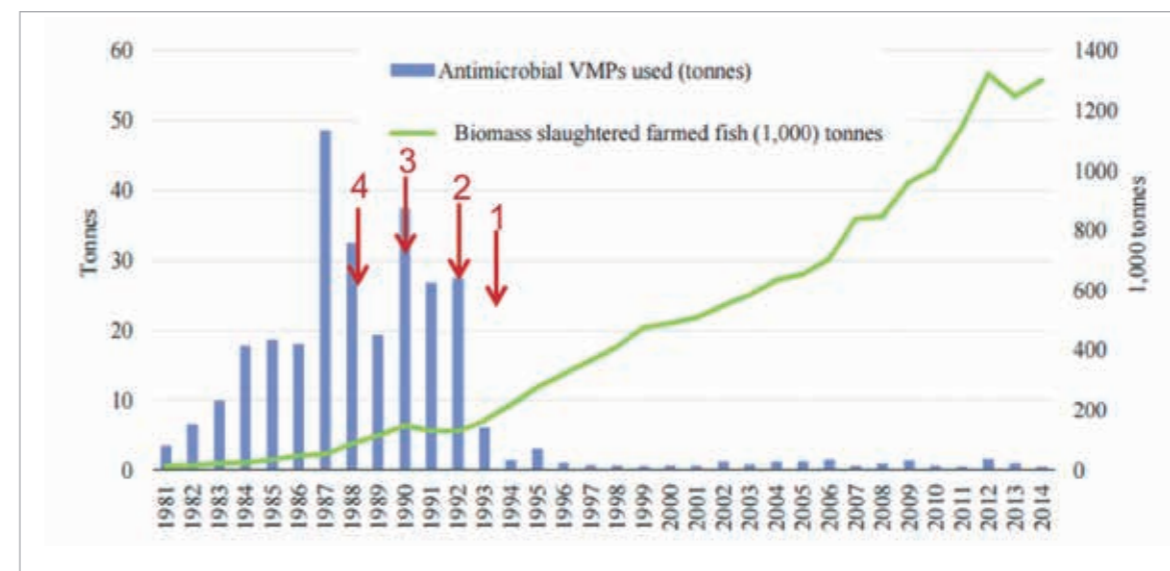


Fig. 1. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway

1 – Vibriosis vaccine, 2 – Furunculosis vaccine, 3 – Oil-based vaccine, 4 – Combination vaccine. NORM-NORM-VET 2014

INTRODUCTION

The aquaculture industry produced globally 65 million tonnes in 2014, representing 150 billion of US \$. Aquaculture industry is a fast growing industry (10 to 12% per year). It is expected that aquaculture should produce over 100 million tonnes of fish in 2050. Today, fish from aquaculture represent 40% of the whole fish consumption globally. It is expected that in 2025 it will be 50%. More than 30 species of fish are produced, as well as shellfish and crustaceans [4].

Until 1980, very few fish vaccines were used in aquaculture. In 1982, vaccines only existed for 2 diseases (Enteric Redmouth disease (ERM) and *Vibrio anguillarum*). Today, vaccines have been developed for more than 25 diseases of fish. Mass vaccination started in the 1990s in the salmonid industry, especially in Norway. Before the generalization of the use of fish vaccines, antibiotics were used extensively to prevent diseases in fish production. The use of new vaccines for salmonids allowed a strong reduction of antibiotic use and a fast development of the industry. It is considered that introduction of mass vaccination in the salmonid industry based on water-in-oil emulsions is one of the major success stories in the growth of the global salmon farming industry [6]. It allowed the salmonid production to grow from a few hundred thousand tonnes during the early 1990s to more than 1.3 million metric tonnes in 2012 (Fig. 1).

The role of the oil adjuvant in the success of vaccination of salmonids is important. It is indeed the stability and slow release of the adjuvanted antigen that allows single intra-peritoneal injection to protect through the 2 to 4 years grow-out period of salmonids. This property made vaccination an economical option for preventing disease and led to almost universal adoption by salmon farmers within a few years [6].

Today, the practice of vaccination by intraperitoneal injection has been slowly transferring to non-salmonid species. This is an important transition as the major growth in finfish aquaculture is now occurring in warm-water species such as tilapia.

Three routes of administration can be considered for fish vaccination: injection, immersion and oral adminis-

tration. Intraperitoneal (IP) injection (Fig. 2) of 0.1 to 0.2 ml of water in oil vaccine is highly efficient and induces high and long term protection. Specific devices are available and injectable fish vaccines are extensively used in farming. However, this route of administration is labour intensive, requires trained vaccination teams, and cannot be performed when very small or very large specimen are concerned.

To avoid these technical issues, immersion and oral vaccination are being considered. Immersion consists in dipping the fish in a bath containing a vaccine for a few minutes. Oral administration consists in mixing the vaccine with the fish feed. Both methods are easier to implement than injection, but their efficacy has been until now limited. They are usually used as a complement to boost injectable vaccines [8], or for vaccination of juveniles when injection is not yet possible. The development of immersion and oral vaccines for fish will require dedicated adjuvants or formulations to improve their efficacy.

Commonly used vaccines are based on inactivated bacterial or viral antigens. New generation vaccines comprise

Fig. 2. Intraperitoneal injection in trout



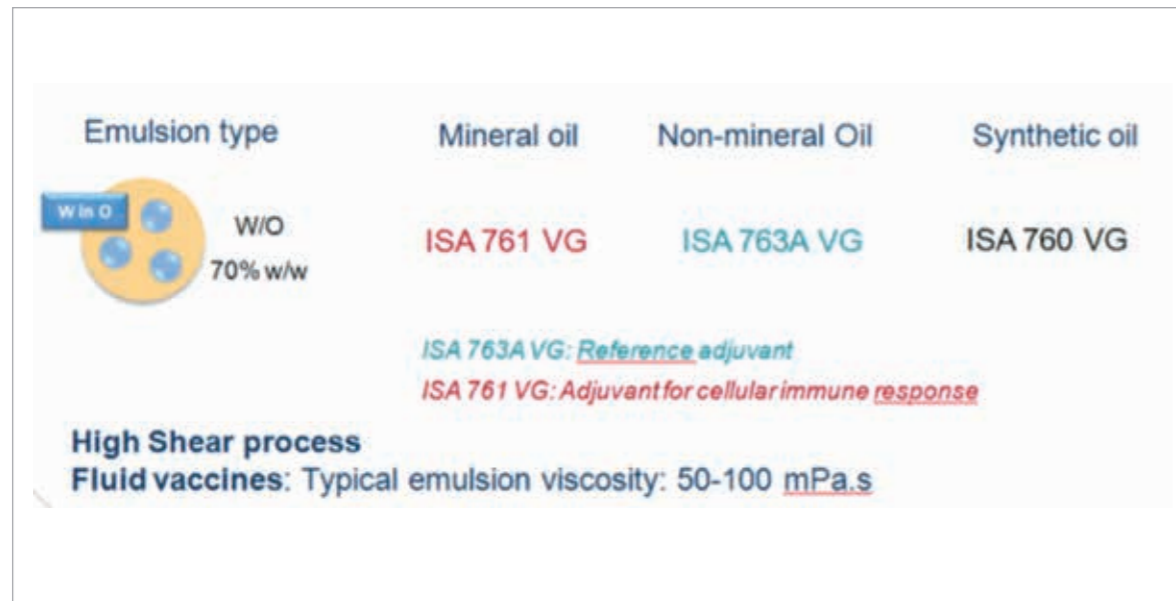


Fig. 3. Montanide™ range for injectable fish vaccines

attenuated or DNA antigens, but still represent a very small market share. Injectable inactivated vaccines are usually formulated with water in oil emulsion adjuvants to induce long term efficacy. As fish are sensitive to IP injection, oil adjuvants must be selected carefully to avoid viscosity and injectability issues (especially in cold water fish) and local reactions at the site of injection, such as melanisation and adhesions in the peritoneal cavity [7]. Such reactions should be avoided as they induce a loss of economic value. The type of oil (mineral, metabolizable, synthetic) and the quality of the oil are critical to ensure the safety and efficacy of vaccines. Metabolizable oils are usually safer than mineral oil for fish vaccines, but mineral oils can induce higher antibody titers and can be used to induce stronger cell mediated immunity.

MATERIALS AND METHODS

Montanide™ range of water-in-oil adjuvants (Fig. 3) has been used for fish vaccination worldwide. In particular, Montanide™ ISA 763A VG is a metabolizable oil based water-in-oil adjuvant that has been shown to be safe and highly efficient for injection of diverse fish species, such as salmon, trout, tilapia, seabass, turbot, catfish, ect. [1-3]. This adjuvant has been used for commercial vaccines formulation in the last decades.

Montanide™ ISA 763A VG is a safe adjuvant that induces only minor reactions after injection. In a safety study for sutchi catfish *Edwardsiella ictaluri* vaccine, Montanide™ ISA 763A VG was formulated with inactivated antigen (10^9 CFU/dose) and 0.1 ml of vaccine was injected to 2x30 catfish of 15 to 30 g. The fish were slaughtered at D21 post injection and local reactions were assessed following Spielberg scoring scale (score 0 (no reaction to score 6 (global adhesion to the organs)). 75% of the fish had score 0 reaction, and no fish showed adhesion above score 1 (Fig. 4).

In another study, the use of Montanide™ ISA 763A VG in a turbot vaccine against *Edwardsiella tarda* increased strongly the duration of immune response compared to non adjuvanted vaccine [2]. At 1 month post injection,

100% of fish vaccinated with the adjuvanted vaccine were protected, compared to 80% in the non adjuvanted group. At 6 months post injection, still 90% of fish vaccinated with the adjuvanted vaccine were still protected, compared to 20% only in the non adjuvanted group [2]. These results and others show that the use of adapted water in oil adjuvant is necessary to protect fish on the long term with only one injection.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to improve the efficacy of immersion and oral vaccines, dedicated adjuvant formulations have been developed and tested. Adjuvants for immersion vaccines should be aqueous adjuvants that can be added to the immersion bath. Montanide™ IMS adjuvants are aqueous adjuvants composed of a micro-emulsion and containing an immunostimulating compound. It was shown that immersion vaccination against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout was improved by the addition of the micro-emulsion adjuvant Montanide™ IMS 1312 VG [5]. This study showed that the vaccine against yersiniosis formulated with Montanide™ IMS 1312 VG induced a strong and long term humoral and cellular immunity, and that the addition of adjuvant allowed reaching above 90% of protection against the disease after challenge, over 10 weeks after vaccination.

Developing efficient oral vaccination for fish would allow mass vaccination of the fish and a strong reduction of the workload necessary for fish vaccination. It would also limit considerably the risks of reactions after vaccination. However, as of today the efficacy of oral vaccination is not sufficient to replace vaccination by injection.

An option to enhance the efficacy of oral inactivated or subunit vaccines would be to improve the formulation of these vaccines. Oral vaccines must be mixed with feed to be administered to the fish. Vaccine can be lost in water and antigen may also be destroyed in the gastrointestinal tract of the fish. Formulations for oral vaccines should thus contain a gastro-protective matrix for

Treatments (volume injected)	Type of local reaction (%)	
	Score 0 (no lesion)	Score 1
Antigen alone 10^9 CFU/ml	98 ± 2	2 ± 2
ISA 763 A VG with 10^9 CFU/ml	77 ± 8	23 ± 8
ISA 760 VG with 10^9 CFU/ml	77 ± 5	23 ± 5
Control (saline buffer)	98 ± 2	2 ± 2

Fig. 4. No lesions above score 1 were observed in adjuvanted groups. Montanide ISA 763A VG is safe for fish vaccination

the antigen, able to stick to fish pellets in water until it has been swallowed by the fish and able to protect the antigen in the acidic part of the fish gastrointestinal tract. Such formulations are being developed and tested to improve oral vaccines.

CONCLUSION

The development of new efficient and safe fish vaccines is necessary to ensure an on-going growth of the aquaculture industry and a reduction of the use of antibiotics and anti-parasitic drugs used in fish farming.

The use of appropriate adjuvants allows the formulation of safe and protective one-shot injectable fish vaccines. The development of more efficient immersion and oral vaccines should allow an efficient mass vaccination of fish in the coming years.

REFERENCES

1. Cao T.T., Tsai M.A., Yang C.D., Wang P.C., Kuo T.Y., HSU-CHUNG GABRIEL Chen H.C.G.S., Chen S.C. Vaccine efficacy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Edwardsiella ictaluri* against *E. tarda* in tilapia // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2014. – Vol.60. – P. 241-250.
2. Castro N., Toranzo A.E., Nunez S., Magarinos B. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) // Fish Shellfish Immunol. – 2008. – Vol. 25 (3). – P. 208-212.

3. Jaafar R.M., Chettri J.K., Dalsgaard Al-Jubury A., Kania P.W., Skov J., Buchmann K. Effects of adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri* // Fish Shellfish Immunol. – 2015. – Vol. 47. – P. 797-806.

4. Fish Vaccines. A short, but remarkable journey / P. Smith // Veterinary Vaccines conference, 3–4 December, 2014, Brussels, Belgium.

5. Soltani M., Shafiei S.H., Yosefi P., Mosavi S.H., Mokhtari A. Effect of Montanide IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Fish Shellfish Immunol. – 2014. – Vol. 37. P. 60-65.

6. Sommerset I., Krossoy B., Biering E., Frost P. Vaccines for fish in aquaculture // Expert Rev. Vaccines. – 2005. – Vol. 4. – P. 89-101.

7. Tafalla C., Bogwald J., Dalmo A.R. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives // Fish Shellfish Immunol. – 2013. – Vol. 35 (6). – P. 1740-1750.

8. Tobar I., Arancibia S., Torres C., Vera V., Soto P., Carrasco C., Alvarado M., Neira E., Arcos S., Tobar J.A. Successive oral immunizations against *Piscirickettsia salmonis* and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids // Frontiers in Immunology. – 2015. – Vol. 6. Article 244.

АНАЛИЗ ВИДОВОГО СОСТАВА И ПОПУЛЯЦИОННОГО УРОВНЯ МИКРОФЛОРЫ В КОНТРОЛЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ СЕПСИСА У КОШЕК

П. А. Руденко

научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, доцент, ФИБХ РАН, г. Пушкино, e-mail: pavelrudenko76@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

В статье приведены данные о проведении анализа видового состава и популяционного уровня микрофлоры в контроле эффективности лечения сепсиса у кошек различными схемами. При диагностике сепсиса отмечено значительное (на 37,7%) превалирование грамотрицательных микроорганизмов над грамположительными, а также наличие представителей рода *Candida*, что свидетельствует о тяжелом течении гнойно-воспалительного процесса у опытных кошек. Приведенные данные также свидетельствуют, что микробная экосистема кишечника при лечении сепсиса эффективнее стабилизируется и приближается к показателям клинически здоровых кошек у животных В₃ группы. Так, у кошек этой группы на фоне лечения сепсиса уже на 7 сутки в пробах фекалий наблюдали высокодостоверное снижение количества представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus* и *Candida* при сравнении с показателями животных до их лечения. Это происходило на фоне высокодостоверного увеличения количества представителей пробиотической микрофлоры, а именно *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, по сравнению с исходными данными. Установлено, что наиболее эффективным было лечение сепсиса у кошек группы В₃, на что указывает уменьшение средних сроков появления грануляций на 6,19 суток, средних сроков заживления ран первичных очагов на 9,91 суток, а также ускорение сроков общего клинического улучшения на 5,78 суток при сравнении с животными группы В₁.

Ключевые слова: хирургическая инфекция; микроорганизмы; сепсис; лечение; пробиотики.

MICROFLORA SPECIES AND POPULATION ANALYSIS FOR FELINE SEPSIS TREATMENT EFFICIENCY CONTROL

P.A. Rudenko

Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Institute of Bioorganic Chemistry under Russian Academy of Sciences, Puschino, e-mail: pavelrudenko76@yandex.ru

SUMMARY

The paper presents data on microflora species and population analysis for feline sepsis treatment efficiency control using different schemes. Sepsis diagnostics demonstrated a significant (by 37.7%) prevalence of gram-negative microorganisms compared to gram-positive ones as well as the presence of *Candida* species which is indicative of severe purulent inflammation in experimental cats. The provided data also suggest that in the course of sepsis treatment intestinal microbe ecosystem stabilizes more effectively and tends towards healthy cat parameters in В₃ group animals. On the seventh day of treatment the cats from the abovementioned group showed a significant decrease in the number of *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus* and *Candida* species in their feces samples in comparison to samples tested before treatment. This happened in parallel to a significant increase in the number of probiotic microflora species, like *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in comparison to initial results. It was established that sepsis treatment was most effective in Group В₃ cats where in average incarcinations appeared 6.19 days earlier than in animals of В₁ Group, primary lesions healed 9.91 days earlier and the total clinical improvement occurred 5.78 days earlier.

Key words: surgery infection, microorganisms, sepsis, treatment, probiotics.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении всей истории медицины хирургическая инфекция является одним из основных препятствий для развития и расширения диапазона хирургических вмешательств. Она возникает в результате проникновения в ткани при различных открытых повреждениях условно-патогенной и патогенной микрофлоры. К настоящему времени, несмотря на значительные успехи в борьбе с гнойно-воспалительными процессами, инфекция в хирургии остается сложной и актуальной проблемой. Инфекция развивается при нарушении равновесия между микроорганизмами, которые загрязняют рану, и состоянием защитных механизмов макроорганизма. Важная роль принадлежит и функциональному состоянию поврежденных тканей. Микробное загрязнение при воспалительных процессах обусловлено распространением хирургической инфекции, появлением новых антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов и их ассоциаций, изменением биологических свойств микроорганизмов, осложнением микробиологической характеристики ран, а также высоким уровнем иммунодепрессии, вызванной различными факторами. Микробный пейзаж при гнойно-воспалительных процессах мягких тканей характеризуется наличием широкого спектра возбудителей и их существенными вариациями в количественном и качественном отношении [2–4]. Ряд ученых [1, 2, 8] настаивает, что в большинстве случаев микрофлора при гнойном воспалении представлена ассоциацией грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Другие исследователи [4] говорят о том, что при открытых гнойно-воспалительных процессах микрофлора представлена аэробными, анаэробными и факультативно анаэробными микроорганизмами как в монокультуре, так и в различных ассоциациях. Кроме того, они указывают, что не существует специфических микробных маркеров отдельных нозологических форм инфекционных осложнений.

Нарастающая воспалительная реакция стремится остановить распространение инфекции, локализовать и подавить ее. Если это удается, некротизированные ткани и микрофлора локализируются, а инфильтрат рассасывается. Если макроорганизм не способен локализовать и подавить инфекцию в первичном очаге, микроорганизмы проникают в кровоток, и возникает бактериемия. В кровеносном русле бактерии размножаются, производят токсины, тем самым обуславливают развитие сепсиса. Сепсис (гнилокровие) — тяжелый гнойно-воспалительный процесс, возникающий при распространении патогенных микроорганизмов и их токсинов по кровеносному либо лимфатическому руслу из первичного гнойного очага в другие органы и ткани организма, сопровождающийся тяжелым клиническим течением и развитием инфекционной полиорганной недостаточности. Бактериальные экзотоксины при этом нарушают функции многих органов. Стремительный выброс эндотоксинов приводит к развитию септического шока. Когда содержание эндотоксина достигает 1 мкг/кг массы, возникающий септический шок становится необратимым, что через два часа приводит к гибели [3].

М. Greiner, G. Wolf, K. Hartmann [7] утверждают, что сепсис у собак и кошек обусловлен грамотрицательными микроорганизмами. Авторы указывают, что при сепсисе у 66 кошек из проб крови изолировали в 45% случаев грамположительные, в 43% — грамотрица-

тельные, а в 12% — анаэробные микроорганизмы. Однако нами найдено сообщение о том, что сепсис обуславливается грамположительными кокками. Так, Pesavento P. A., Bannasch M. J., Bachmann R. et al. [5] указывают, что при сепсисе у кошек из проб крови и внутренних органов изолировали *S. canis*. Следует отметить, что в результате укусов и царапин кошек и собак могут возникать гнойно-воспалительные процессы мягких тканей с неблагоприятным течением, остеомиелит, сепсис, которые обусловлены *P. multocida* [6].

В связи со сказанным выше, целью нашей работы явилось проведение анализа видового состава и популяционного уровня микрофлоры в контроле эффективности лечения сепсиса у кошек различными схемами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные, которые поступали в клиники ветеринарной медицины и которым был поставлен предварительный диагноз — сепсис, в дальнейшем методом конвертов были распределены в группы В₁, В₂ и В₃. Для проведения микробиологических исследований у кошек В₁–В₃ групп отбирали периферическую кровь до начала лечения, а также на 5 сутки терапии. Качественные и количественные микробиологические исследования проводили также из проб гнойного экссудата, отобранного из первичных гнойных очагов кошек, больных сепсисом. У животных всех опытных групп терапевтические мероприятия имели два направления: лечение первичного гнойного очага и общая интенсивная терапия. Хирургическая обработка первичного гнойного очага заключалась в рассечении тканей, вскрытии гнойных полостей, карманов и создании свободного доступа ко всем участкам раны. Животным всех опытных групп с абдоминальным сепсисом проводили широкую лапаротомию, эвакуацию гнойного экссудата, санацию брюшной полости, ушивание лапаротомной раны и подшивание трубчатых полихлорвиниловых дренажей. Через эти дренажи 2 раза в сутки проводили санацию брюшной полости: кошкам группы В₁ — 1% раствором диоксида, животным группы В₂ — 1% водной суспензией аэросила А-300, а животным группы В₃ — 1% водной суспензией препарата «Дилаксил». Общая интенсивная терапия во всех опытных группах включала антибактериальную терапию и детоксикационную терапию. Антибактериальную терапию проводили в 2 этапа: 1 этап — эмпирическое назначение комбинации антимикробных препаратов широкого спектра действия, 2 этап — продолжение либо смена режима антибиотикотерапии на основании бактериологических исследований с учетом антибиотикочувствительности выделенной микрофлоры. На 1 этапе назначали цефалоспорины III поколения — цефтриаксон (внутримышечно в дозе 75–100 мг/кг 1 раз в день в течение 5–7 суток) в комбинации с метронидазолом (в дозе 7–10 мг/кг внутривенно капельно 1 раз в сутки 5 дней). На 2 этапе у 17 (35,4%) животных возникла необходимость в замене режима антибиотикотерапии с учетом определения чувствительности, изолированной из первичного очага микрофлоры к антибиотикам. При этом 15 (31,2%) кошкам, больным сепсисом, применяли цефалоспорины IV поколения цефепим (внутримышечно в дозе 50 мг/кг 2 раза в день в течение 5–7 суток) в комбинации с метронидазолом, а 2 (4,2%) животным при крайне тяжелом течении абдоминального сепсиса (у больных

с послеоперационным перитонитом) — гатифлоксацин (внутривенно в дозе 15–20 мг/кг в разведении с 0,9% натрия хлоридом 1:10 1 раз в день в течение 5 дней) в сочетании с метронидазолом. У животных В₁–В₃ опытных групп регидратационная терапия заключалась во внутривенном капельном введении раствора натрия хлорида 0,9% в дозе 10 мл/кг + 5% раствора глюкозы в дозе 10 мл/кг + реосорбелакта в дозе 5 мл/кг + рефортана в дозе 2,5 мл/кг. Кроме этого животным группы В₂ применяли сорбционную (пероральное назначение аэросила А-300 2 раза в сутки), а кошкам группы В₃ — пробиотико-сорбционную (пероральное назначение пробиотико-сорбционного препарата «Сорбелакт» 2 раза в сутки) терапии.

Микробиологические исследования проводили общепринятыми методами. Идентификацию по биохимическим свойствам осуществляли в соответствии с «Определителем бактерий Берджи». Определение серогрупп *E. coli* проводили с помощью набора «Сыворотки «О»-коагглютинирующие» (ФГУП «Армавирская биофабрика»). Количество микроорганизмов в 1,0 см³ исходного материала (С) рассчитывали по формуле и выражали в логарифмах с основанием 10:

$$C = (N/V) \times K,$$

где: N — среднее количество колоний в 1 бактериологической чашке; V — объем суспензии, который наносит во время посева на поверхность агара; K — кратность разведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окончательный диагноз сепсис ставили на основании изолирования гемокультур микроорганизмов из проб периферической крови, отобранной у больных животных. Контроль бактериемии больных сепсисом кошек проводили двукратно, а именно: кровь отбирали во время первичного осмотра животных, а также на 5 сутки лечения, после получения данных микробиологических исследований и определения антибиотикограммы изолированной микрофлоры.

Анализ полученных позитивных данных по изоляции гемокультур свидетельствует, что чаще всего из

отобранной периферической крови кошек при сепсисе выделяли грамотрицательную микрофлору. Так, из проб крови, отобранной до начала лечения, нами было изолировано 37 (67,2%) культур грамотрицательных микроорганизмов от общего количества изолированных бактерий. При этом чаще выделяли кишечные и синегнойной палочки — 36,3 и 18,2% соответственно от общего количества изолятов. Необходимо отметить, что из проб крови, отобранной на 5 сутки лечения от 17 животных, была обнаружена бактериемия. При этом также чаще всего выделяли представителей грамотрицательной микрофлоры, а именно *P. vulgaris* — 6 (28,6%), *P. aeruginosa* — 4 (19,0%) и *E. coli* O8 — 3 (14,2%) культуры от общего количества изолятов.

Стоит отметить, что у трех животных группы В₁ и двух кошек группы В₂ на 5 сутки микробиологического исследования несколько изменился микробный пейзаж. Это может быть связано с феноменом кишечной транслокации микроорганизмов, которая не прекратилась на фоне эмпирического назначения антибиотиков в начале лечения.

Микробиологический анализ первичных гнойных очагов при сепсисе у кошек включал в себя, прежде всего, идентификацию микрофлоры, определение уровня микробной контаминации гнойного экссудата или тканей, а также определение чувствительности изолированных микробных агентов к антибактериальным средствам. Результаты микробиологических исследований содержимого первичных очагов при сепсисе у кошек представлены на рисунке.

Полученные данные свидетельствуют, что всего была изолирована 161 культура микроорганизмов, которые отнесены к 15 видам. При этом чаще выделяли *E. coli* — 31 (19,2%), *S. aureus* — 23 (14,4%), *P. aeruginosa* — 22 (13,7%) и *P. vulgaris* — 19 (11,8%) от общего количества изолятов.

При проведении серологической типизации выделенных культур кишечных палочек установлено, что 18 (11,2%), 2 (1,2%), 4 (2,5%) и 7 (4,3%) изолятов от общего количества выделенных микроорганизмов отнесены к O8, O18, O26 и O111 серотипам соответственно. Кроме этого, 49 (89,1%) от общего количества выделенных из проб крови и содержимого первичных очагов изолятов *E. coli* были отнесены к гемолизин-продуцирующим культурам. Необходимо также отметить, что в патологическом материале, отобранном от кошек из первичных гнойных очагов при сепсисе, нами было изолировано 46 (28,7%) штаммов грамположительной микрофлоры, 107 (66,4%) культур грамотрицательных бактерий, а также 8 (4,9%) изолятов грибов *S. albicans*.

При диагностике сепсиса отмечено значительное (на 37,7%) превалирование грамотрицательных микроорганизмов над грамположительными, а также наличие представителей рода *Candida*, что свидетельствует о тяжелом течении гнойно-воспалительного процесса у опытных кошек. Следует отметить, что при получении результатов микробиологических исследований на 4 сутки лечения 8 животным, от которых были изолированы штаммы грибов *S. albicans*, к схемам терапии было добавлено антимикотическое средство — флуконазол.

При определении патогенности изолированных из проб периферической крови и содержимого первичных очагов штаммов микроорганизмов установлено, что 194 (81,8%) культуры вызывали гибель белых мышей. Необходимо также обратить внимание на то, что

из патологического материала, отобранного от 11 животных, которые на фоне лечения погибли, из внутренних органов изолировали идентичную микрофлору, которая была выделена от них из проб периферической крови и содержимого первичных очагов.

Результаты определения содержания микроорганизмов в 1 г тканей, отобранных из первичных гнойных очагов кошек при сепсисе, нашли свое отражение в таблице.

Данные, представленные в таблице, показывают, что содержание микроорганизмов в отобранном от кошек из первичных очагов патматериале находится на практически одинаковом уровне. Это косвенно свидетельствует, что животных всех опытных групп были однородны по тяжести течения и выразительности патологического процесса. Необходимо также отметить, что содержание всех изолированных родов микроорганизмов превышало «критический» уровень (10⁵–10⁶ КОЕ в 1 г тканей или см³ гнойного экссудата).

Кроме приведенных выше исследований, микробиологический анализ включал также определение чувствительности к антимикробным средствам штаммов микроорганизмов, выделенных из проб периферической крови и содержимого гнойных первичных очагов деструкции до начала лечения. Полученные данные свидетельствуют, что более высокая антимикробная активность отмечена у антимикробных средств группы фторхинолонов, а также антибиотиков цефалоспоринового ряда III и IV поколений. Так, наибольшее количество чувствительных изолятов наблюдали к гатифлоксацину — 208 (100,0%), цефепиму — 205 (98,5%), энрофлоксацину — 173 (83,2%) и цефтриаксону — 172 (82,7%) от общего количества исследованных культур бактерий. Необходимо отметить, что по результатам антибиотикограммы изолированных микроорганизмов, отобранных на 5 сутки лечения больных сепсисом кошек, возникла необходимость в замене режима выбранной схемы эмпирической антимикробной терапии. При этом пяти, шести и четырем кошкам В₁, В₂ и В₃ групп соответственно вместо цефтриаксона был назначен цефепим, а одному животному из В₂ и одному из В₃ группы при наиболее тяжелом течении перитонита цефтриаксон был заменен на гатифлоксацин.

В связи с тем, что у 29 (60,4%) животных при лечении сепсиса первичным очагом выступала брюшная полость (кошки с перитонитом), у нас не было возможности провести сравнение состава микрофлоры по ее содержанию в гнойном очаге в динамике терапевтических мероприятий. Поэтому единственным микробиологическим критерием оценки эффективности лечения стало сравнение по количественным показателям состава микрофлоры кишечника, которая была изолирована от кошек, больных сепсисом. Полученные данные свидетельствуют, что микробная экосистема кишечного тракта при лечении сепсиса эффективнее стабилизируется и приближается к показателям клинически здоровых кошек у животных В₃ группы. Так, у кошек этой группы на фоне лечения сепсиса уже на 7 сутки в пробах фекалий наблюдали высокодостоверное (p<0,001) снижение количества представителей родов *Staphylococcus* в 2,1 раза, *Streptococcus* в 2,0 раза, *Escherichia* в 1,3 раза, *Pseudomonas* в 1,9 раза, *Klebsiella* в 2,2 раза, *Citrobacter* в 1,9 раза, *Proteus* в 1,8 раза и *Candida* в 1,9 раза при сравнении с показателями животных до лечения. Это происходило на фоне

высокодостоверного (p<0,001) увеличения количества представителей пробиотической микрофлоры, а именно: *Lactobacillus* в 2,4 раза — с 3,01±0,10 до 7,24±0,17 (lg) и *Bifidobacterium* в 1,5 раза — с 4,62±0,17 до 6,60±0,26 (lg) по сравнению с исходными данными. Кроме этого, у животных группы В₃ на 7 сутки лечения отмечено достоверное снижение количества представителей родов *Staphylococcus* — в 1,5 раза, *Streptococcus* — в 1,5 раза, *Pseudomonas* — в 1,4 раза, *Klebsiella* — в 1,5 раза, *Citrobacter* — в 1,4 раза, *Proteus* — в 1,4 раза, *Candida* — в 1,5 раза (p<0,001), а также *Enterobacter* — в 1,1 раза (p<0,05); при высокодостоверном увеличении количества представителей *Lactobacillus* в 2,2 раза — с 3,22±0,13 до 7,24±0,17 (lg) и *Bifidobacterium* в 1,6 раза — с 4,20±0,18 до 6,60±0,26 (lg) при сравнении с кошками группы В₂. Необходимо также отметить, что у четырех (21,0%) животных группы В₃, у которых до лечения из проб фекалий не выделялись представители рода *Lactobacillus*, уже на 7 сутки терапии изолировали лактобактерии в количестве 10⁶ КОЕ, что также свидетельствует об эффективности примененного препарата «Сорбелакт».

Таким образом, при проведении детального анализа видового состава и популяционного уровня микрофлоры в контроле эффективности лечения сепсиса у кошек различными схемами установлено, что наиболее эффективной оказалась схема лечения у 2 опытной группы (В₃). На это указывает уменьшение средних сроков появления грануляций на 6,19 суток, средних сроков заживления ран первичных очагов на 9,91 суток, а также ускорение сроков общего клинического улучшения на 5,78 суток при сравнении с животными группы В₁. Необходимо отметить, что у животных группы В₃ отмечен и самый низкий показатель летальности, а именно у двух (10,5%) животных от общего количества больных кошек. У животных этой группы также было зарегистрировано самое низкое количество постсептических осложнений. Установлено, что наиболее частыми осложнениями у кошек, больных сепсисом, были полиорганная недостаточность, пневмония, септический шок и менингоэнцефалит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ видового состава микрофлоры, изолированной из проб крови кошек при сепсисе, говорит о том, что чаще всего из отобранной периферической крови изолировали грамотрицательную микрофлору. Так, из проб крови, отобранной до начала лечения, было изолировано 37 (67,2%) культур грамотрицательных микроорганизмов от общего количества изолированных бактерий. Необходимо отметить, что из проб крови, отобранной на 5 сутки лечения от 17 животных, также чаще всего выделяли представителей грамотрицательной микрофлоры, а именно *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* и *E. coli*.

Микробная экосистема кишечного тракта при лечении сепсиса эффективнее стабилизируется и приближается к показателям клинически здоровых кошек у животных В₃ группы. Так, у кошек этой группы на фоне лечения сепсиса уже на 7 сутки в пробах фекалий наблюдали высокодостоверное (p<0,001) снижение количества представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus* и *Candida* при сравнении с показателями животных до их лечения. Это происходило на фоне

Рис. Результаты микробиологических исследований содержимого первичного очага при сепсисе у кошек (n=48)

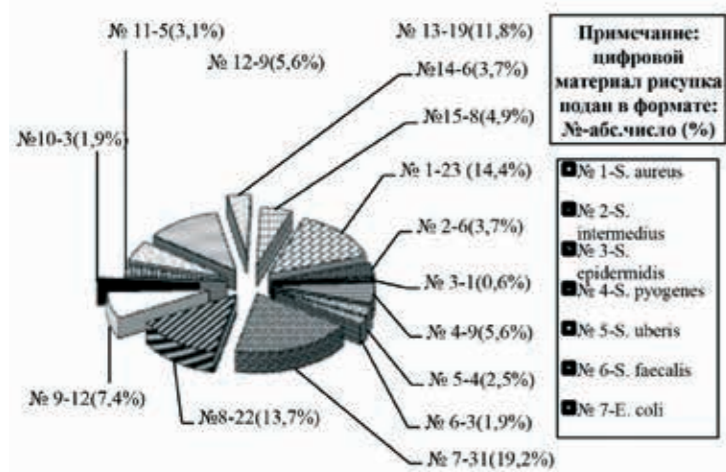


Таблица
Количество микроорганизмов (lg) в 1 г тканей, отобранных из первичных очагов кошек при сепсисе

Род микроорганизма	Количество изолятов из первичных очагов от кошек:		
	контрольной группы (В ₁), n=12	1 опытной группы (В ₂), n=17	2 опытной группы (В ₃), n=19
<i>Staphylococcus spp.</i>	8,88±0,22	8,86±0,01	8,93±0,17
<i>Streptococcus spp.</i>	8,08±0,25	8,18±0,20	8,18±0,21
<i>Escherichia spp.</i>	9,44±0,20	8,87±0,01	9,12±0,12
<i>Pseudomonas spp.</i>	8,61±0,25	7,90±0,01	8,04±0,11
<i>Klebsiella spp.</i>	7,27±0,42	7,08±0,25	6,97±0,15
<i>Enterobacter spp.</i>	6,78±0,01	6,86±0,04	6,79±0,03
<i>Citrobacter spp.</i>	7,77±0,58	7,60±0,19	8,77
<i>Proteus spp.</i>	7,60±0,22	7,13±0,15	6,99±0,15
<i>Candida spp.</i>	6,20±0,43	6,27±0,22	6,36±0,25

фоне высокодостоверного (p<0,001) увеличения количества представителей *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* по сравнению с исходными данными. Кроме этого, у животных группы В₃ на 7 сутки лечения отмечено достоверное снижение количества представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Candida* (p<0,001), а также *Enterobacter* (p<0,05) при высокодостоверном увеличении количества представителей *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* при сравнении с кошками группы В₂.

Пробиотико-сорбционные препараты «Дилаксил» и «Сорбелакт» при комплексной интенсивной терапии кошек, больных сепсисом, положительно влияют как на течение воспалительного процесса в целом, так и на отдельные звенья патогенетического процесса: процесс заживления первичного гнойного очага, микрофлору, интоксикацию и тому подобное, — на что указывает уменьшение средних сроков появления грануляций на 6,19 суток, средних сроков заживления ран первичных очагов на 9,91 суток, а также ускорение сроков общего клинического улучшения на 5,78 суток при сравнении с животными группы В₁.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Применение серебросодержащих повязок при лечении неосложненных послеоперационных ран у собак и кошек / А. В. Шестаков, Л. С. Литвинова, Е. А. Богданов [и др.] // Ветеринарная биология. — Санкт-Петербург. — 2013. — №3 (19). — С. 78.
2. Руденко П. А. Современные подходы к борьбе с гнойно-воспалительными процессами у мелких до-

машних животных // Российский ветеринарный журнал (Мелкие домашние животные). — 2016. — №3. — С. 26–29.

3. Хірургічні хвороби котів / В. Й. Іздепський, С. М. Масліков, П. А. Руденко [та ін.]: Навчальний посібник для аграрних закладів освіти 2-4 рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина» Луганськ: Елтон-2, 2012. — 140 с.

4. Association between elevated pre-operative glycosylated hemoglobin and post-operative infections after non-emergent surgery / J. M. Blankush, I. M. Leitman, A. Soleiman [et al.] // Ann. Med. Surg. (Lond). — 2016. — Vol.9. — №10. — P. 77–82.

5. Fatal *Streptococcus canis* infections in intensively housed shelter cats / P. A. Pesavento, M. J. Bannasch, R. Bachmann [et al.] // Vet. Pathol. — 2007. — №44(2). — P. 218–221.

6. Fukuchi T., Morisawa Y. A. A case of cat-scratch-induced *Pasteurella multocida* infection presenting with disseminated intravascular coagulation and acute renal failure // Kansenshogaku Zasshi. — 2009. — № 83(5). — P. 557–560.

7. Greiner M., Wolf G., Hartmann K. A retrospective study of the clinical presentation of 140 dogs and 39 cats with bacteraemia // J. Small. Anim. Pract. — 2008. — №49(8). — P. 378–383.

8. The inter-rater reliability of the diagnosis of surgical site infection in the context of a clinical trial / J. Nuttall, N. Evaniew, P. Thornley [et al.] // Bone. Joint. Res. — 2016. — №5(8). — P. 347–352.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

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

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

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

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



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



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10-12 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, включающие фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300-500 знаков с пробелами);
6. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи;

7. Введение;
8. Материалы и методы;
9. Результаты и обсуждения;
10. Выводы и заключение;
11. Список литературы (т.е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008. Не более 5-7 источников;
12. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек

на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tif или .jpg (рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно);
13. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии/руководителя, заверенные круглой печатью учреждения.

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

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

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

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

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

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: Лаврухина Ольга Игоревна, телефон: +7 (905) 611-26-77

«Ветеринария сегодня» – это прекрасная возможность заявить о себе миру!



ФГБУ «ВНИИЗЖ» образовано в 1958 г. как Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт (ВНИИЯИ). Сегодня учреждение является уникальным, признанным во всем мире Центром по решению проблем здоровья животных.

ОСНОВНЫМИ НАПРАВЛЕНИЯМИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ФГБУ «ВНИИЗЖ» В ОБЛАСТИ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ ПТИЦ ЯВЛЯЮТСЯ:

– разработка и внедрение в ветеринарную практику высокоэффективных лечебно-профилактических препаратов против болезней птиц, диагностических тест-систем и методов.

ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ:

– болезнь Гамборо, болезнь Ньюкасла, бронхит, болезнь Марека, ССЯ-76, инфекционный ларинготрахеит, инфекционный энцефаломиелит, реовирусный теносиновит, гидроперикардит, микоплазмоз, оспа, гепатит утят, метапневмовирусная инфекция птиц и т.д.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Определение антител в ИФА с использованием тест-систем отечественного и импортного производства
- Индикация в полимеразной цепной реакции (ПЦР) геномов вирусов и бактерий:
 - инфекционного бронхита кур
 - инфекционной бурсальной болезни
 - инфекционного энцефаломиелита птиц

- инфекционного ларинготрахеита
- синдрома снижения яйценоскости-76
- болезни Марека
- ньюкаслской болезни
- реовируса птиц
- аденовируса птиц
- метапневмовируса птиц
- гриппа птиц
- анемии птиц
- *Mycoplasma gallisepticum*
- *Mycoplasma synoviae*
- *Mycoplasma meleagridis*
- гепатита уток
- энтерита гусей
- оспы
 - Идентификация с помощью секвенирования геномов вирусов инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни, энцефаломиелита, реовируса и др.
 - Бактериологические исследования: гемофилез, орнитобактериоз, сальмонеллез, пастереллез и др.

Важным аспектом деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» является оказание научно-методической и практической помощи ветеринарным специалистам лабораторий и птицеводческих предприятий, разработка мероприятий для профилактики и ликвидации инфекционных болезней птиц. 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 птиц.

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/UCVPBOvjIZcxbEmJ1Qw3YYcw>