



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

# ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ  
ЖУРНАЛ

VETERINARY TODAY RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



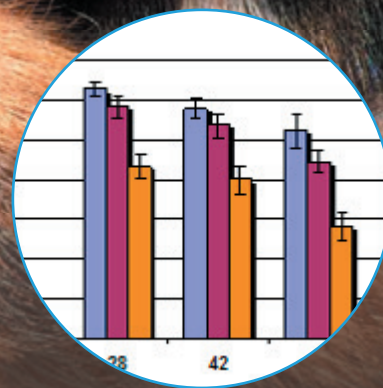
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
РЕПРОДУКЦИОННЫХ СВОЙСТВ  
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ  
СВИНЕЙ ИЗОЛЯТА  
ОДИНЦОВО 02/14 В ПЕРВИЧНЫХ  
КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК  
стр. 5

COMPARATIVE ANALYSIS OF  
PROPAGATION PROPERTIES OF  
ASFV ODINTSVO 02/14 ISOLATE  
IN PRIMARY CELL CULTURES  
p. 10



ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ  
ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ  
A/H5N1, ВЫЗВАВШЕГО  
ВСПЫШКИ БОЛЕЗНИ  
В АЛТАЙСКОМ КРАЕ В 2014 Г.  
стр. 23

ISOLATION AND EXAMINATION  
OF A/H5N1 AVIAN INFLUENZA  
VIRUS THAT CAUSED  
DISEASE OUTBREAKS  
IN ALTAI KRAI IN 2014  
p. 23



ИЗУЧЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО  
ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ,  
ИММУНИЗИРОВАННЫХ  
ЭМУЛЬСИОННЫМИ  
ПРОТИВЯЩУРНЫМИ  
ВАКЦИНАМИ  
стр. 55

STUDY OF HUMORAL  
IMMUNITY IN ANIMALS  
IMMUNIZED WITH EMULSION  
FMD VACCINES  
p. 55

# 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
- 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»
- 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

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

## Ветеринария сегодня №1 (20) 2017 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, Елена Медведева  
e-mail: lavruhina@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 «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», 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. министра сельского хозяйства РФ, 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.** – зам. министра, 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 ВНИВИПИТ Россельхозакадемии, г. Воронеж.

**Дизайн и верстка:** Мария Поваляева, Алексей Мелешкин  
**Корректор:** Лариса Грибникова

**Менеджер по подписке и дистрибуции:** Павел Сафронов, +7 (903) 505 33 23

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. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

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

Подписано в печать 13.03.2017

Дата выхода 20.03.2017

## СОДЕРЖАНИЕ

### НОВОСТИ

3

О проведении выездного семинара «Практические аспекты профилактики болезней птиц в промышленном птицеводстве»

4

О проведении IV Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ»

### БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

5

Д.В. Шарыпова, И.Ю. Жуков, Н.Н. Власова, О.С. Пузанкова, В.Л. Гаврилова, А.С. Иголкин, Н.Н. Коропова, Т.В. Жбанова  
Сравнительный анализ репродукционных свойств вируса африканской чумы свиней изолята Одинцово 02/14 в первичных культурах клеточек

### БОЛЕЗНИ ПТИЦ

13

М.Н. Митрофанова, Л.В. Малахова, Б.Л. Манин  
Культивирование реовируса птиц штамма «ARV04/02» в различных клеточных системах

17

П.С. Ярославцева, М.А. Волкова, З.Б. Никонова, Н.С. Мудрак, Ир.А. Чвала  
Сравнение иммунного ответа цыплят-бройлеров при экспериментальном заражении изолятами метапневмовируса птиц подтипов А и В

23

И.А. Чвала, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, Д.А. Алтунин, В.Ю. Сосипаторова  
Выделение и изучение вируса гриппа птиц А/Н5N1, вызвавшего вспышки болезни в Алтайском крае в 2014 г.

### БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

30

А.А. Фунтиков, С.Р. Кременчугская  
Вспышки ящура на территории Южной Кореи и экономические последствия

34

Е.С. Кострова, О.П. Бьядовская, Е.В. Пешкова, О.В. Прунтова  
Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для определения титра антител к *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови крупного рогатого скота

38

Р.А. Кривonos, Г.А. Джаилиди, А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, О.Ю. Черных, В.Н. Шевкопляс, С.Г. Дресвянникова, Д.В. Коломиец, С.В. Тихонов  
Проблема профилактики и ликвидации очагов нодулярного дерматита крупного рогатого скота

50

М.А. Шевченко, М.И. Доронин, Н.Д. Ключкина, А.А. Шишкова, Д.А. Лозовой, Д.В. Михалишин  
Влияние концентрации сыворотки крови в питательной ростовой среде на репродукцию клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура

55

С.Р. Кременчугская, Н.Н. Луговская, Т.К. Майорова, А.С. Шарыпов  
Изучение гуморального иммунитета у животных, иммунизированных эмульсионными противоящурными вакцинами

### ЭПИЗООТОЛОГИЯ

58

В.В. Макаров, Д.А. Лозовой, А.А. Стрижаков  
Парамиксовирусные зоонозы, ассоциированные с рукокрылыми

64

Д.А. Лозовой  
Анализ эпизоотической ситуации по особо опасным и экономически значимым болезням животных в государствах — участниках СНГ (2013–2015 гг.)

34

Ye.S. Kostrova, O.P. Bjadovskaya, Ye.V. Peshkova, O.V. Pruntova  
Design of indirect ELISA-based test-system for determination of *Mannheimia haemolytica* antibody titre in bovine sera

45

R.A. Krivonos, G.A. Dzhailidi, A.V. Mischenko, V.A. Mischenko, O.Yu. Chernykh, V.N. Shevkoplyas, S.G. Dresvyannikova, D.V. Kolomyets, S.V. Tikhonov  
Problem of lumpy skin disease outbreak prevention and eradication

50

M.A. Shevchenko, M.I. Doronin, N.D. Klukina, A.A. Shishkova, D.A. Lozovoy, D.V. Michalishin  
The influence of concentration of blood serum in the nutrient growth medium on the reproduction of the cell line ВНК-21/2-17 and FMD virus

55

S.R. Kremenchugskaya, N.N. Lugovskaya, T.K. Mayorova, A.S. Sharypov  
Study of humoral immunity in animals immunized with emulsion FMD vaccines

### ЭПИЗООТОЛОГИЯ

58

V.V. Makarov, D.A. Lozovoy, A.A. Strizhakov  
Paramyxoviral zoonoses associated with *Chiroptera*

64

D.A. Lozovoy  
Analysis of highly dangerous and economically important animal disease situation in CIS countries in 2013-2015

## CONTENTS

### PORCINE DISEASE

10

D.V. Sharypova, I.Yu. Zhukov, N.N. Vlasova, O.S. Puzankova, V.L. Gavrilova, A.S. Igolkin, N.V. Koropova, T.V. Zhanova  
Comparative analysis of propagation properties of ASFV Odintsovo 02/14 isolate in primary cell cultures

### AVIAN DISEASE

13

M.N. Mitrofanova, L.V. Malakhova, B.L. Manin  
Cultivation of avian reovirus ARV04/02 strain in different cell cultures

17

P.S. Yaroslavtseva, M.A. Volkova, Z.B. Nikonova, N.S. Mudrak, Ir.A. Chvala  
Comparison of immune response in broiler chickens after experimental inoculation with isolates of avian metapneumovirus subtypes A and B

23

I.A. Chvala, A.V. Andriyasov, N.G. Zinyakov, D.A. Altunin, V.Yu. Sosipatorova  
Isolation and examination of A/H5N1 avian influenza virus that caused disease outbreaks in Altai Krai in 2014

### BOVINE DISEASE

30

A.A. Funtikov, S.R. Kremenchugskaya  
FMD outbreak in South Korea and its economic consequences

### НОВОСТИ

## О ПРОВЕДЕНИИ ВЫЕЗДНОГО СЕМИНАРА «ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ»

С 14 по 15 декабря 2016 года на базе АО «Агрокомплекс» им. Н.И. Ткачева (станция Выселки, Краснодарский край) состоялся выездной семинар «Практические аспекты профилактики болезней птиц в промышленном птицеводстве», организованный подведомственным Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Данное мероприятие проводилось впервые, его формат предусматривал выступление специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ» и проведение круглого стола по итогам встречи. Тематика выступлений была подобрана в соответствии с актуальными проблемами современного промышленного птицеводства и с учетом опроса мнений участников семинара.

Специалисты ФГБУ «ВНИИЗЖ» поделились своими достижениями и опытом работы; провели консультации по методам диагностики и профилактики особо опасных болезней птиц, способам иммунизации. Должное внимание было уделено научному сопровождению после вакцинации.

Главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ», доктор ветеринарных наук В. Ирза представил подробную информацию о высокопатогенном гриппе птиц, попутно осветив другие особо опасные болезни.

Главный научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», доктор биологических наук Н. Мудрак озвучила доклад на

тему «Диагностика вирусных болезней птиц, в т.ч. особо опасных (высокопатогенный грипп птиц и ньюкаслская болезнь)», подробно остановившись на интерпретации результатов как показателей эффективности иммунопрофилактики, а также ознакомив собравшихся с программами вакцинации.

Научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», кандидат ветеринарных наук С. Похвальный рассказал о методах борьбы с инфекционным ларинготрахеитом и оспой птиц и их профилактике.

Ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», кандидат ветеринарных наук В. Мельников уделит особое внимание правильной вакцинации против болезни Марекка, представил порядок действий для конкретного использования препарата, а также рассказал о факторах, влияющих на вакцинацию.

Ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», кандидат ветеринарных наук А. Потехин рассмотрел клинические признаки гемофилизы птиц, факторы патогенности.

По окончании семинара состоялся круглый стол, где были подведены итоги и вручены сертификаты установленного образца.

Прошедшая встреча стала продуктивной для всех участников мероприятия. К деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» был проявлен особый интерес со стороны участников семинара и СМИ.



# О ПРОВЕДЕНИИ IV МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ДОСТИЖЕНИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ В ВЕТЕРИНАРНУЮ ПРАКТИКУ» НА БАЗЕ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

6 декабря 2016 года на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» состоялась IV Международная научная конференция «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», посвященная 55-летию учреждения аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В работе конференции приняли участие 78 ученых, из них 51 человек — молодые ученые, представители научных учреждений и высших учебных заведений Российской Федерации.

С приветственным словом к собравшимся участникам конференции обратились: директор ФГБУ «ВНИИЗЖ» Д. Лозовой; доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБНУ «Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии» им. Я.Р. Коваленко М. Гулюкин; доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Почетный профессор ФГБУ «ВНИИЗЖ» А. Рахманов и председатель Совета молодых ученых, к.в.н. А. Варенцова.

В соответствии с программой конференции заслушаны и обсуждены 24 доклада по следующим тематическим направлениям: биотехнология (культивирование вирусов и клеток, производство вакцин), эпизоотология (мониторинг инфекционных болезней сельскохозяйственных, диких и домашних животных, вакцинопрофилактика, иммунология), диагностика и молекулярная биология вирусов, а также безопасность и качество пищевых продуктов и кормов.

С приглашенными докладами выступили ведущие ученые в области ветеринарии: В. Макаров, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ «Российский университет дружбы народов»; О. Прунтова, доктор биологических наук, профессор,

главный эксперт ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ»; Н. Мудрак, доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Опубликован сборник материалов конференции (47 научных статей) объемом 296 печатных страниц. Все научные труды участвовали в конкурсе лучших работ. По итогам конкурса дипломом первой степени награждена В. Данилова («Вирулентность изолятов возбудителя инфекционного ринита кур»), дипломом второй степени — М. Шевченко («Влияние концентрации сыворотки крови в питательной ростовой среде на репродукцию клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура»), дипломом третьей степени — П. Ярославцева («Сравнение иммунного ответа цыплят-бройлеров при экспериментальном заражении изолятами метапневмовируса птиц подтипов А и В»), А. Соловьёв («Оценка возможности применения изотопных отношений углерода в составе аминокислот при установлении географического происхождения мясных продуктов»), Р. Кривонос («Проблема профилактики и ликвидации очагов нодулярного дерматита крупного скота»).

Почетными грамотами отмечены доклады: аспиранта ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» К. Беловой — «За лучшее ораторское мастерство»; научного сотрудника ФГБНУ «ВНИИТБП», к.б.н. О. Анисин — «За лучшую презентацию».

Участники конференции и Совет молодых ученых ФГБУ «ВНИИЗЖ» выражают глубокую благодарность директору, научно-образовательному отделу и группе научно-методической работы отдела координации НИР, обеспечившим успешное проведение конференции, которая позволила поделить опытом и обсудить новейшие исследования и разработки в области ветеринарии.



УДК 619:578.842.1:57.082.26

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕПРОДУКЦИОННЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ИЗОЛЯТА ОДИНЦОВО 02/14 В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Д.В. Шарыпова<sup>1</sup>, И.Ю. Жуков<sup>2</sup>, Н.Н. Власова<sup>3</sup>, О.С. Пузанкова<sup>4</sup>, В.Л. Гаврилова<sup>5</sup>, А.С. Иголкин<sup>6</sup>, Н.В. Коропова<sup>7</sup>, Т.В. Жбанова<sup>8</sup>

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

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

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

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

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

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

<sup>7</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: koropova@arriah.ru

<sup>8</sup> заведующий аспирантурой, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhbanoa@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Изучены репродукционные свойства вируса африканской чумы свиней изолята Одинцово 02/14 в первичных культурах клеток в зависимости от добавления в питательную среду различных сывороток крови. В результате проведенных исследований установлено, что репродукция вируса наиболее успешно происходит в клетках костного мозга свиней и свиной почки при использовании фетальной сыворотки КРС и многоцелевого заменителя сыворотки FS FetalClone II.

Ключевые слова: африканская чума свиней, изолят, титр вируса, первичная культура клеток свиней, сыворотка крови, фетальная сыворотка.

## ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — особо опасное трансграничное контагиозное вирусное заболевание свиней всех видов и возрастов, характеризующееся лихорадкой, цианозом кожных покровов и обширными геморрагиями во внутренних органах инфицированных животных.

До настоящего времени не разработаны высокоэффективные средства специфической профилактики АЧС, в связи с чем определяющее значение в борьбе с данным заболеванием имеет своевременная диагностика и соблюдение высоких норм биобезопасности при ведении свиноводства. Чувствительность применяемых лабораторных методов диагностики в первую очередь зависит от концентрации вируса в испытуемых образцах (пробах) патологического материала.

В некоторых случаях, с целью накопления вируса АЧС в диагностических концентрациях, возникает необходимость проведения нескольких пассажей выделенного изолята вируса АЧС в различных перевиваемых и первичных культурах клеток свиней. Вирусосодержащий материал, полученный в различных культурах клеток, используется в диагностических

следованиях, при изучении биологических, молекулярно-генетических свойств выделенных изолятов вируса АЧС [1, 3, 5, 8, 10, 11].

*In vitro* вирус АЧС репродуцируется в клетках гемопоэтического происхождения — макрофагах/моноцитах из различных тканевых источников. К числу таких клеток относятся: альвеолярные макрофаги (АМС), клетки костного мозга (КМС), клетки почки (СП), спленоциты селезенки (СС), клетки тестикул (ТС) свиней. Многими авторами отмечено, что репродукция возбудителя АЧС активно происходит во фракции высокоадгезивных клеток общего пула макрофагов костного мозга свиней и менее активно — в лимфоцитах, нейтрофилах, эндотелиальных клетках [6, 10, 11].

Жизнеспособный вирус АЧС способен вызывать специфическую модуляцию мембран зараженных клеток, приводит к адсорбции эритроцитов на поверхности инфицированных клеток (гемадсорбции).

Гетерогенная популяция вируса АЧС обуславливает проявление гемадсорбции в первичных культурах клеток одновременно в двух или трех вариантах: рыхлая — инфицированные клетки адсорбируют до

20 эритроцитов; промежуточная — 20–40 эритроцитов; плотная — 40–80 эритроцитов на своей поверхности [5].

Показано, что при культивировании вируса *in vitro* вместо сыворотки крови свиней или КРС можно использовать многоцелевой заменитель сыворотки с дополнительными компонентами для клеток — FS FetalClon II, который содержит высокоочищенный термообработанный бычий сывороточный альбумин, бычий трансферрин, бычий инсулин и не содержит факторов роста — стероидных гормонов, глюкокортикоидов, факторов клеточной адгезии [8].

В отечественных и зарубежных литературных источниках недостаточно широко освещены сведения о размножении современных изолятов вируса АЧС в первичных культурах клеток свиней (КК КМС, ЛС, АМС, СП) с учетом добавления различных стимуляторов репродукционных свойств [1, 2, 5, 6, 8]. В связи с этим исследование по изучению этих свойств вируса АЧС, выделенного в последние годы на территории Российской Федерации, в различных первичных культурах клеток свиней является актуальным.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В работе использовали поросят 2–4-месячного возраста живой массой 20–30 кг, полученных из благополучного по инфекционным болезням хозяйства Владимирской области.

Для исследований, после полного обескровливания, от поросят отбирали трубчатые кости, а также почки, селезенку и тестикулы [6, 9].

**Культуры клеток.** Клеточную суспензию инокулировали в лунки культуральных 96-луночных планшетов, пластиковые культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> (матрасы), при этом в питательную среду добавляли 20%: 1) фетальной сыворотки КРС (ФС КРС; № 1 — PAN BIOTECH, США; № 2 — ФС КРС, PAA, Австрия); 2) нормальной сыворотки крови свиней (НСС); 3) клон II фетальной сыворотки КРС (FS FetalClon II, NuClone, США).

Инфицирование культур клеток проводили вирусом АЧС (изолят Одинцово 02/14), выделенным от дикого кабана на территории Московской области в 2014 г. Множественность заражения составляла 0,1–0,01 ГАД<sub>50</sub>/кл.

Подсчет клеток проводили как с использованием стандартных прикладных методов (подсчет в камере Горяева), так и в автоматическом счетчике клеток Countess™ (Invitrogen™, Корея).

Инфицированные культуры клеток культивировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе с содержанием 5% углекислого газа.

Репродукцию вируса АЧС в первичных культурах клеток контролировали при помощи реакций гемадсорбции и прямой иммунофлюоресценции.

Определение титра инфекционности вируса АЧС проводили путем его титрования в различных первичных культурах клеток при помощи реакции гемадсорбции (РГАд). Для титрования вируса АЧС использовали 2-суточный монослой культур клеток, выращенный в лунках 96-луночных микропланшетов. Постановку РГАд проводили по «классической схеме» с использованием рабочей суспензии эритроцитов поросенка [7]. Расчет инфекционного титра вируса проводили через 5–7 суток после заражения первичных культур клеток по методу Кербера (1931) в модификации И.П. Ашмарина (1959, 1962) и выражали в Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Наличие вируса АЧС во всех используемых в исследовании первичных культурах клеток подтверждали в реакции прямой иммунофлюоресценции (РПИФ). Для постановки РПИФ согласно инструкции использовали специфические ФИТЦ-иммуноглобулины для иммунофлюоресцентной диагностики АЧС (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров), а также моноклональные антитела 18 BG3-FITC, полученные на протеин vpr72, меченные ФИТЦ (INGENASA, Испания). Наблюдение за проявлением цитопатического действия (ЦПД) проводили с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа ULWCD 0,30 Olympus модели СКХ41.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На одном из этапов проводимых работ для получения сравнимых образцов различных первичных культур клеток необходимо было подобрать их оптимальную посадочную концентрацию. В ходе исследований, при посеве с равной концентрацией клеток, количество клеток КМС, прикрепившихся ко дну пластикового матраса, было больше по сравнению с клетками СС. Для полу-

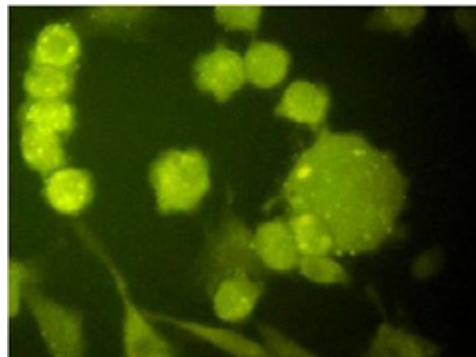


Рис. 1. Образование цитоплазматических включений в инфицированных вирусом АЧС клетках, формирование гигантской многоядерной клетки в РПИФ (окуляр ×10, объектив ×60)

Fig. 1. Formation of cytoplasmic inclusions in ASF virus-infected cells, formation of multinuclear giant cell, direct immunofluorescence test (ocular ×10; objective ×60)

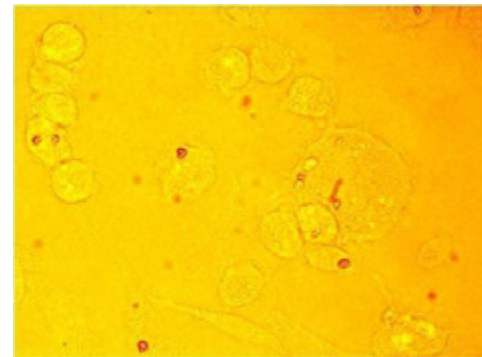


Рис. 2. Образование цитоплазматических включений в инфицированных вирусом АЧС клетках, формирование гигантской многоядерной клетки в светлом поле (окуляр ×10, объектив ×60)

Fig. 2. Formation of cytoplasmic inclusions in ASF virus-infected cells, formation of multinuclear giant cell observed against light background (ocular ×10; objective ×60)

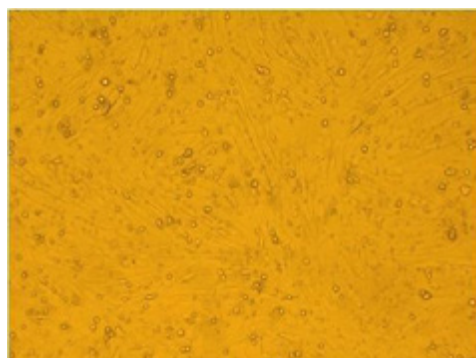


Рис. 3. Культура клеток тестикул свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр ×10; объектив ×10)

Fig. 3. Intact porcine testicle cell culture, negative control (ocular ×10; objective ×10)

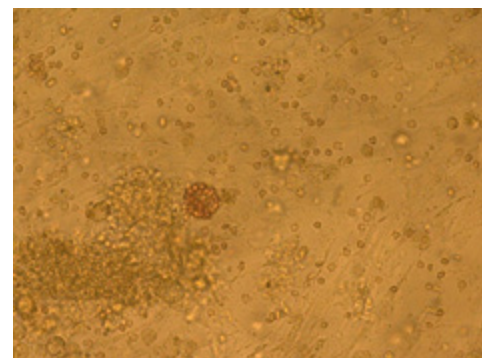


Рис. 4. Культура клеток тестикул свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 4. Porcine testicle cell culture infected with ASF virus (ocular ×10; objective ×40)

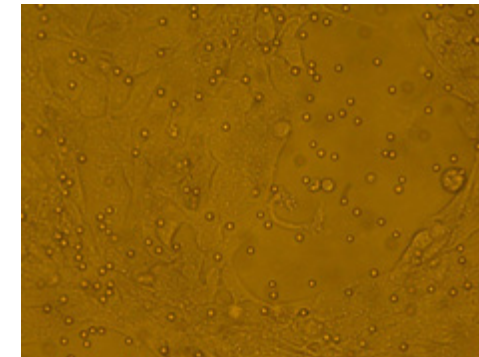


Рис. 5. Культура клеток почки свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 5. Intact porcine kidney cell culture, negative control (ocular ×10; objective ×40)

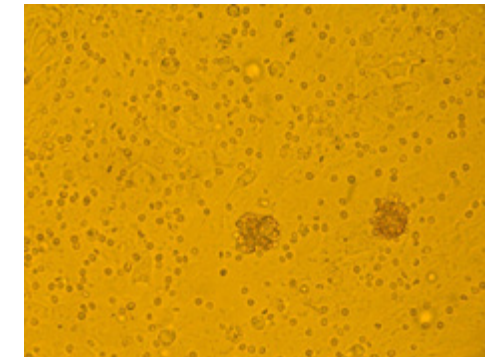


Рис. 6. Культура клеток почки свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 6. Porcine kidney cell culture infected with ASF virus (ocular ×10; objective ×40)

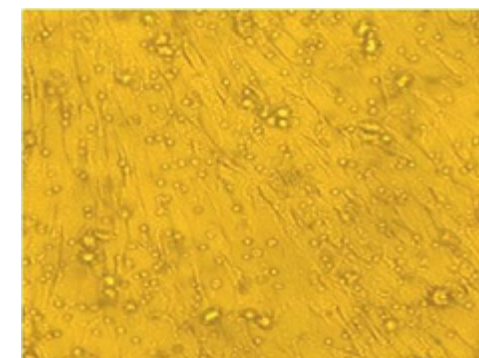


Рис. 7. Культура клеток костного мозга свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр ×10; объектив ×20)

Fig. 7. Intact porcine bone marrow cell culture, negative control (ocular ×10; object lens ×20)

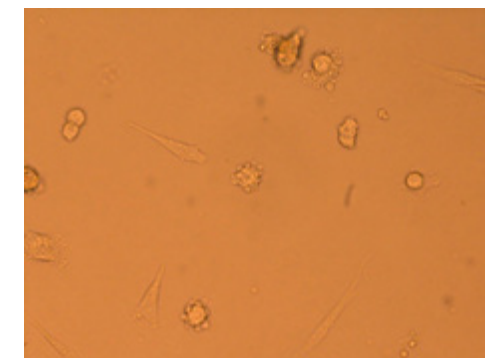


Рис. 8. Культура клеток костного мозга свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 8. Porcine bone marrow cell culture infected with ASF virus (ocular ×10; object lens ×40)

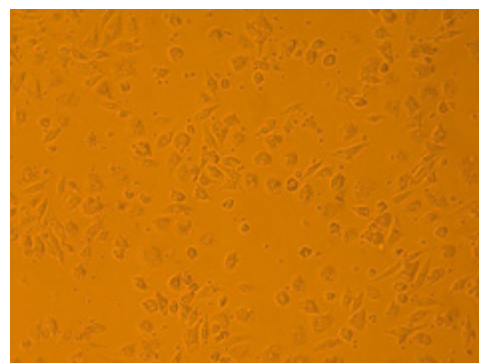


Рис. 9. Культура клеток селезенки свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр  $\times 10$ ; объектив  $\times 20$ )

Fig. 9. Intact porcine spleen cell culture, negative control (ocular  $\times 10$ ; objective  $\times 20$ )

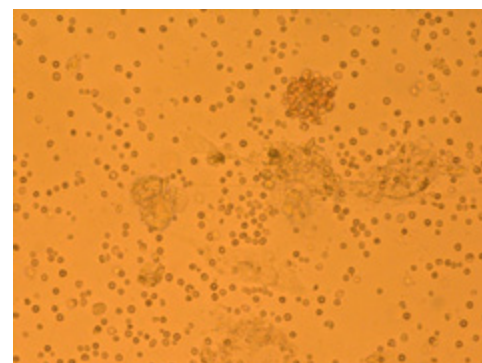


Рис. 10. Культура клеток селезенки свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр  $\times 10$ ; объектив  $\times 40$ )

Fig. 10. Porcine spleen cell culture infected with ASF virus (ocular  $\times 10$ ; objective  $\times 40$ )

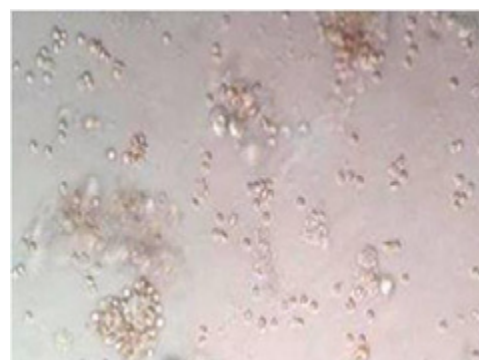


Рис. 11. Промежуточная и рыхлая гемадсорбция (окуляр  $\times 10$ ; объектив  $\times 20$ )

Fig. 11. Intermediate and fluffy hemadsorption (ocular  $\times 10$ ; objective  $\times 20$ )

чения плотного клеточного монослоя концентрация клеток СП при посеве варьировала от 500 тыс./см<sup>3</sup> до 2 млн/см<sup>3</sup>, что в четыре раза больше, чем требуемая концентрация клеток ТС. Клеточный монослой ТС формировался через 24–48 ч, а для клеток СП выростал при этих концентрациях через 72–96 ч.

При посеве культур клеток КМС и СС использовали концентрацию клеток 5–6 млн/см<sup>3</sup>, монослой клеток формировался через 48–72 ч.

Выход клеточной суспензии в рабочей концентрации из органов, отобранных от одного поросенка, составлял: для КМС — 400–500 мл, для СС — 150–200 мл, для ТС — 200–300 мл, а максимальный объем составлял 600–800 мл — для клеток СП.

Таким образом, наиболее технологичной в получении являлась культура клеток СП, далее следовали КМС и ТС, и наименьший выход наблюдался для клеток СС.

Репродукция вируса АЧС в первичных культурах клеток КМС, СС, СП, ТС сопровождалась характерными морфологическими изменениями инфицированных клеток: деаггезирование отдельных клеток, вследствие чего клетки округлялись и затем наблюдался пикноз клеток.

В ходе исследований наблюдали, что через 18–36 ч в цитоплазме инфицированных клеток появлялись характерные включения, вирусспецифичность которых подтверждали в РПИФ с использованием ФИТЦ-

конъюгата моноклональных антител к vpr72 вируса АЧС. Впоследствии клетки сливались друг с другом, образуя многоядерные гигантские клетки (рис. 1–2), спустя некоторое время отмечали их деструкцию, происходившую в результате вирусиндуцированного апоптоза.

На рис. 3, 5, 7, 9 представлены изображения интактных (отрицательный контроль), а на рис. 4, 6, 8, 10 — инфицированных вирусом АЧС первичных культур клеток ТС, СП, КМС и СС соответственно.

Результаты проведенных исследований показали, что при заражении культур клеток КМС, СП, СС, ТС вирусом АЧС (изолят Одинцово 02/14) наблюдали различные типы гемадсорбции (рис. 11): плотную (у 65–80% инфицированных клеток), промежуточную (у 10–15% инфицированных клеток) и рыхлую (у 5–10% инфицированных клеток).

Анализ скорости обнаружения вируса АЧС в РГАД показал, что минимальный срок появления гемадсорбции после инфицирования регистрировался для культуры клеток СС через 12–24 ч, в то время как для КМС и СП — через 48 ч, а ТС — через 48–72 ч.

Следовательно, для повышения скорости и эффективности диагностических исследований целесообразно использовать культуру клеток СС, в то время как остальные культуры клеток (КМС, СП и ТС) могут быть использованы для получения препаративных количеств вируса.

В ходе изучения репродукционных свойств вируса АЧС в первичных культурах клеток при добавлении различных сывороток (ФС КРС, НСС) и многоцелевого заменителя сыворотки FS FetalClon II отмечено, что наибольшие титры (7,25±0,56 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) накопления вируса наблюдались в культуре клеток КМС с использованием FS FetalClon II через 120–168 ч после инокуляции вируса. Результаты расчета инфекционной активности вируса АЧС, полученного в различных культурах клеток с добавлением данных сывороток, представлены в таблице.

Определено, что при использовании FS FetalClon II титр вируса АЧС на культуре клеток КМС составлял 7,25±0,56 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, что в среднем на логарифм выше, чем при использовании ФС КРС № 2 (6,25±0,43 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) и НСС (6,00±0,46 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>). На культуре клеток СС самые высокие титры были получены при использовании ФС КРС № 2 (6,50±0,58 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), что на 3 логариф-

#### Таблица

Инфекционная активность вируса АЧС, полученного в первичных культурах клеток с использованием различных сывороток крови (n=5)

Наименование культуры клеток	Гемадсорбирующие титры вируса АЧС, полученные в первичных культурах клеток с использованием различных сывороток, Ig ГАД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>		
	ФС КРС №2	НСС	FS FetalClon II
КМС	6,25±0,43	6,00±0,46	7,25±0,56
СС	6,50±0,58	2,75±0,25	3,50±0,36
СП	6,25±0,25	5,75±0,25	6,00±0,25

ма выше, чем при использовании FS FetalClon II (3,50±0,36 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) и на 4 логарифма выше, чем при использовании НСС (2,75±0,25 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

Вероятно, что ФС КРС наиболее эффективно поддерживает жизнедеятельность клеток СС, что и отражается в таких значительных отличиях в титрах. На культуре клеток СП лучшие результаты получены при использовании ФС КРС № 2 (6,25±0,25 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), немного хуже — при использовании FS FetalClon II (6,00±0,25 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) и НСС (5,75±0,25 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа результатов проведенных исследований предложено для повышения скорости и эффективности диагностических исследований использовать культуру клеток СС, в то время как культуры клеток КМС, СП и ТС — для получения препаративных количеств вируса.

При изучении репродукции вируса АЧС изолята Одинцово 02/14 с использованием культуры клеток КМС выявлены наибольшие титры с применением фетальных сывороток FS FetalClone II (7,25±0,56 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) и ФС КРС (6,25±0,43 Ig ГАД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

Таким образом, в результате проведенных исследований подтверждено, что ФС КРС наиболее стабильно и эффективно поддерживает жизнедеятельность клеток СС, СП и КМС, а FS FetalClone II — только для культуры клеток КМС.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышников П.И. Ветеринарная вирусология: учебное пособие. — Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. — 113 с.
- Ветеринарный энциклопедический словарь / гл. ред. В.П. Шишков. — М.: «Советская энциклопедия», 1981. — С. 273–274, 412–413, 464–465.
- Вирус африканской чумы свиней: культивирование, свойства, индикация. Эффективность различных методов выращивания вируса африканской чумы свиней в гемопозитических клетках / Н.И. Закутский, Т.Г. Широкова, Н.С. Неверовская, С.Г. Юрков // Сельскохозяйственная биология. — 2014. — № 4. — С. 58–63.
- Львов Д.К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. — М.: МИА, 2013. — С. 152–154.

5. Макаров В.В. Вирусология. — URL: [http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf\\_makarov/asf\\_makarov\\_virusologia.pdf](http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf_makarov/asf_makarov_virusologia.pdf) (дата обращения: 11.04.16).

6. Методические рекомендации по получению культуры клеток костного мозга свиней для изучения культуральных свойств изолятов вируса африканской чумы свиней / А.А. Варенцова, И.Ю. Жуков, В.Л. Гаврилова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 14 с.

7. Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре костного мозга свиней / А.А. Варенцова, И.Ю. Жуков, В.Л. Гаврилова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 21 с.

8. Патология клеток лимфоидной ткани, in vitro инфицированных вирусом африканской чумы свиней / Е.М. Каралова, Г.Е. Восканян, Х.В. Саркисян [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2011. — № 1. — С. 33–37.

9. Оптимизация условий получения культуры клеток костного мозга свиней / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.А. Варенцова [и др.] // Молодежь и наука XXI: сб. научных трудов IV Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. — Т. 1. — С. 46–52.

10. De Leon P., Bustos M.J., Carrascosa A.L. Laboratory methods to study African swine fever virus // Virus Res. — 2013. — Vol. 173, № 1. — P. 168–179.

11. IL-23/IL-17/G-CSF pathway is associated with granulocyte recruitment to the lung during African swine fever / Z. Karalyan [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2016. — Vol. 179. — P. 58–62.

# COMPARATIVE ANALYSIS OF PROPAGATION PROPERTIES OF ASFV ODINTSOVO 02/14 ISOLATE IN PRIMARY CELL CULTURES

D.V. Sharypova<sup>1</sup>, I.Yu. Zhukov<sup>2</sup>, N.N. Vlasova<sup>3</sup>, O.S. Puzankova<sup>4</sup>, V.L. Gavrilova<sup>5</sup>, A.S. Igolkin<sup>6</sup>, N.V. Koropova<sup>7</sup>, T.V. Zhananova<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sharipova@arriah.ru

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

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

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

<sup>5</sup> Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: gavrilova\_vl@arriah.ru

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

<sup>7</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: koropova@arriah.ru

<sup>8</sup> Head of Postgraduate Training Unit, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zhananova@arriah.ru

## SUMMARY

Odintsovo 02/14 isolate of African swine fever virus was tested for its propagation properties in primary cell cultures with adding different sera to the nutrient medium. The test results showed that the virus propagation was the most successful in porcine bone marrow and porcine kidney cells when fetal bovine serum and FS FetalClone II, multipurpose serum substitute were added.

**Key words:** African swine fever, isolate, virus titre, porcine primary cell culture, serum, fetal serum.

## INTRODUCTION

African swine fever (ASF) is a highly dangerous transboundary contagious viral disease of pigs of all species and ages characterized by fever, skin cyanosis and extensive hemorrhages in internal organs of infected animals.

So far, no highly effective means for specific ASF prevention have been developed. Therefore, early disease diagnosis and high biosecurity in pig industry are of importance for combating disease. Sensitivity of used laboratory diagnostic methods depends first of all on the virus concentration in tested samples of pathological materials.

In some cases it is necessary to passage the recovered ASFV isolate several times in different continuous and primary porcine cell cultures for ASF virus accumulation at diagnostic concentrations. The virus-containing material yielded from different cell cultures is used for diagnostic tests and for testing ASFV isolates for their biological, molecular-genetic properties [1, 3, 5, 8, 10, 11].

ASF virus *in vitro* propagates in hematopoietic cells, macrophages/monocytes of different tissue origins. They include porcine alveolar macrophages (AM), bone marrow cells (BMC) kidney cells (KC), splenocytes (SC) and testicle cells (TC). Many authors note that ASF agent actively propagates in highly adhesive cell fraction of porcine bone marrow macrophage pool and less actively propagates in lymphocytes, neutrophils and endothelial cells [6, 10, 11].

Viable ASF virus is capable to induce specific modulation of infected cell membranes and erythrocyte adsorption

onto surface of infected cells (hemadsorption).

Heterogeneous ASF virus population produces hemadsorption in primary cell cultures manifested simultaneously in two or three variants: fluffy – infected cells adsorb up to 20 erythrocytes; intermediate – 20-40 erythrocytes; dense – 40-80 erythrocytes onto their surface [5].

It was shown that FS FetalClone II, multipurpose serum substitute with additional components for cells, that contains highly purified heat treated bovine serum albumin, bovine transferrin, bovine insulin and does not contain growth factors – steroid hormones, glucocorticoids and cell adhesion factors, can be used for *in vitro* cultivation of the virus instead of porcine and bovine sera [8].

There is no sufficient evidence on propagation of current ASFV isolates in porcine primary cell cultures (BMC, leukocytes, AMC, KC) supplemented with different propagation stimulants [1, 2, 5, 6, 8] in national and foreign literature. Therewith, tests of ASF viruses recently isolated in the Russian Federation for the said properties are of current importance.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Two-four month-old piglets (body weight- 20-30 kg) obtained from infectious disease-free farms located in the Vladimir Oblast were used.

Tubular bones as well as kidneys, spleen and testicles were collected from the piglets for tests after their complete bleeding [6, 9].

**Table**  
Infectivity of ASF virus propagated in different primary cell cultures supplemented with various sera (n=5)

Cell culture	Hemadsorbing ASFV titres in primary cell cultures supplemented with different sera, Ig HAdU <sub>50</sub> /cm <sup>3</sup>		
	FBS No.2	NPS	FS FetalClone II
BMC	6.25±0.43	6.00±0.46	7.25±0.56
SC	6.50±0.58	2.75±0.25	3.50±0.36
KC	6.25±0.25	5.75±0.25	6.00±0.25

**Cell cultures.** Cell suspension was added to wells of 96-well culture plate, plastic 25 cm<sup>2</sup> culture flasks. Thereat, the nutrient medium was supplemented with 20% of: 1) fetal bovine serum (FBS; No.1 – PAN BIOTECH, USA; No. 2 – FBS, PAA, Austria); 2) normal porcine serum (NPS); 3) FBS clone II (FS FetalClone II, HyClone, USA).

The cell cultures were infected with Odintsovo 02/14 isolate of ASF virus recovered from wild boar in the Moscow Oblast in 2014. Multiplicity of infection was 0.1–0.01 HAdU/cell.

Cell counting was performed with both standard methods (counting in Goryaev chamber) and with Countess™ automated cell counter (Invitrogen™, South Korea).

Infected cell cultures were cultivated in CO<sub>2</sub>-incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

Haemadsorption test and direct immunofluorescence test were used for control of ASF virus propagation in primary cell cultures.

Infectivity titre of ASF virus was determined by its titration in different primary cell cultures with haemadsorption test (HADT). A 2-day monolayer of cell cultures grown in wells of 96-well microplate was used for ASFV titration. Haemadsorption test was performed with a classical method using working porcine erythrocyte suspension [7]. The infectivity titre of the virus was calculated with Karber method (1931) modified by I.P. Ashmarin (1959, 1962) 5-7 days after infection of primary cell cultures and expressed in Ig HAdU<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

Presence of ASFV in all primary cell cultures used for tests was confirmed by direct immunofluorescence test (DIF test). Specific FITC-immunoglobulins for immunofluorescence diagnosis of ASF (State Scientific Institution «National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of the Russian Academy of Agricultural Sciences», Pokrov, RF) as well as 18 BG3-FITC, FITC-labeled monoclonal antibodies prepared against vp72 protein, (INGENASA, Spain) were used for direct immunofluorescence test. The cell cultures were observed for cytopathogenic effect (CPE) under luminescent inverted ULWCD 0.30 Olympus microscope, CKX41 Model.

## RESULTS AND DISCUSSION

It was required to select optimal seeding density at one of the stages of preparation of comparable specimens of

different primary cell cultures. During tests with similar cell seeding density the number of BMC attached to plastic flask bottom was higher as compared to SC. The seeding density of KC used for dense cell monolayer preparation varied from 500 ths/cm<sup>3</sup> to 2 mln/cm<sup>3</sup> that was four times higher than the required TC seeding density. TC monolayer formed 24-48 hours after seeding whereas KC monolayer formed 72-96 hours after seeding with the same seeding density.

BMC and SC cultures were seeded with density of 5-6 mln/cm<sup>3</sup> and their monolayers formed 48-72 hours after seeding.

Cell culture yield at working concentration derived from organs collected from one piglet was as follows: for BMC – 400-500 ml, for SC – 150-200 ml, for TC – 200-300 ml, maximum yield was obtained for KC and was 600-800 ml.

Thus, KC culture was the most technological since its yield was the highest, as BMC and TC yields were lower and SC yield was the lowest.

ASF virus propagation in primary BMC, SC, KC, TC cultures was accompanied with characteristic morphological changes in infected cells: disadhesion of some cells resulted in cell rounding and then cell pyknosis.

Characteristic inclusions specific for the virus that was confirmed by direct immunofluorescence test using FITS-conjugated monoclonal antibodies against ASFV vp72 were observed in cytoplasm of infected cells 18-36 hours after infection during examinations. Then, cells fused together and formed multinuclear giant cells (Fig. 1-2, P. 6), and later cell destruction resulted from the virus-induced apoptosis was observed.

Fig. 3, 5, 7, 9 (P. 6-8) show images of intact cells (negative control), and Fig. 4, 6, 8, 10 (P. 6-8) – primary TC, KC, BMC and SC cultures infected with ASF virus, respectively.

Test results showed that hemadsorption of various types occurred in BMC, KC, SC, TC cultures infected with ASF virus (Odintsovo 02/14 isolate) (Fig. 11, P. 8): dense (in 65-80% of infected cells), intermediate (in 10-15% of infected cells) and fluffy (in 5-10% of infected cells).

Analysis of speed of ASF virus detection with direct immunofluorescence test showed that hemadsorption appeared in SC cultures 12-24 hours after infection (minimum period), in BMC and KC cultures 48 hours after infection and in TC cultures 48-72 hours after infection.

Therefore, it is reasonable to use SC culture to increase speed and effectiveness of diagnostic tests, whereas other cell cultures (BMC, KC and TC) can be used for yielding virus amounts required for diagnostic tests.

Tests of ASF virus for its propagation properties in primary cell cultures supplemented with different sera (FBS, NPS) and FS FetalClon II, multipurpose serum substituent, showed that the virus accumulated at the highest titres ( $7.25 \pm 0.56 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ) in BMC culture supplemented with FS FetalClon II 120-168 hours after virus inoculation. Calculated infectivity titres of ASF virus propagated in different cell cultures supplemented with the above-mentioned sera are given in Table below.

It was shown that ASF virus titre was  $7.25 \pm 0.56 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$  in BMC culture supplemented with FS FetalClon II that was on average 1lg higher than that one in BMC supplemented with FBS No.2 ( $6.25 \pm 0.43 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ) and NPS ( $6.00 \pm 0.46 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ). In SC culture ASF virus titres were the highest when the SC culture was supplemented with FBS No. 2 ( $6.50 \pm 0.58 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ), that was 3 lg higher than that one in SC culture supplemented with FS FetalClon II ( $3.50 \pm 0.36 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ) and 4 lg higher than that one in SC culture supplemented with NPS ( $2.75 \pm 0.25 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ).

FBS seems to be the most effective at maintaining splenocytes (SC) that is reflected in significant differences in titres. For KC culture, the best results ( $6.25 \pm 0.25 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ) were observed when FBS No.2 was used. When KC culture was supplemented with FS FetalClon II and NPS the results were slightly worse,  $6.00 \pm 0.25 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$  and  $5.75 \pm 0.25 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ , respectively.

## CONCLUSION

Based on the analysis of the test results it was suggested to use SC culture to improve diagnostic test speed and effectiveness. BMC, PK and TC cultures can be used to prepare virus amounts required for diagnostic tests.

When Odintsovo 02/14 isolate of ASF virus was tested for its propagation properties in BMC culture the highest titres were detected in BMC culture supplemented with FS FetalClone II ( $7.25 \pm 0.56 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ) and FBS ( $6.25 \pm 0.43 \text{ lg HAdU}_{50}/\text{cm}^3$ ).

Thus, the test results confirm that FBS maintains SC, KC and BMC cultures the most sustainably and effectively whereas FS FetalClone II is the most effective at maintaining BMC culture only.

## REFERENCES

1. Baryshnikov P.I. Veterinary Virology: Textbook. – Bar-naul: AGAU publishing, 2006. – 113 p.
2. Veterinary Encyclopedic Dictionary / chief editor V.P. Shishkov. – M.: Sovetskaya Encyclopedia, 1981. – P. 273-274, 412-413, 464-465.
3. African swine fever virus: cultivation, properties, indication. Effectiveness of different ASFV cultivation methods in hematopoietic cells / N.I. Zakutsky, T.G. Shirokova, N.S. Neverovskaya, S.G. Yurkov // Agricultural Biology. – 2014. – No. 4. – P. 58-63.
4. Lvov D.K. Manual for Virology. Human and animal viruses and viral infections. – M.: MIA, 2013. – pp. 152-154.
5. Makarov V.V. Virology. – URL: [http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf\\_makarov/asf\\_makarov\\_virusologia.pdf](http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf_makarov/asf_makarov_virusologia.pdf) (accessed date: 11.04.16).
6. Guidelines for porcine bone marrow cell culture preparation for testing African swine fever virus isolates for their culture properties / A.A. Varentsova, I.Yu. Zhukov, V.L. Gavrilova [et al.]; FGBI «ARRIAH». – Vladimir, 2014. – 14 p.
7. Guidelines for African swine fever virus isolation and titration in porcine bone marrow culture / A.A. Varentsova, I.Yu. Zhukov, V.L. Gavrilova [et al.]; FGBI «ARRIAH». – Vladimir, 2014. – 21 p.
8. Pathology of lymphoid cells in vitro infected with African swine fever virus / Ye.M. Karalova, G.Ye. Voskan-yan, Kh.V. Sarkisyan [et al.] // Voprosy virusologii. – 2011. – No. 1. – P. 33-37.
9. Optimization of conditions for porcine bone marrow cell culture preparation / I.Yu. Zhukov, I.V. Shevchenko, A.A. Varentsova [et al.] // Young People and Science in XXI: Proceedings of the IV International Scientific and Practical Conference of Young Scientists. – Ulyanovsk: Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, 2014. – V. 1. – P. 46-52.
10. De Leon P, Bustos M.J., Carrascosa A.L. Laboratory methods to study African swine fever virus // Virus Res. – 2013. – Vol. 173, № 1. – P. 168-179.
11. IL-23/IL-17/G-CSF pathway is associated with granulocyte recruitment to the lung during African swine fever / Z. Karalyan [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2016. – Vol. 179. – P. 58-62.



УДК 619:616.72-002-022.6:636.52/58:57.082.26

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РЕОВИРУСА ПТИЦ ШТАММА «ARV04/02» В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

М.Н. Митрофанова<sup>1</sup>, Л.В. Малахова<sup>2</sup>, Б.Л. Манин<sup>3</sup>

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

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

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

## РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по изучению культивирования вируса реовирусного теносиновиита кур в различных клеточных системах. Установлено, что штамм «ARV04/02» способен к репродукции во всех исследуемых линиях клеток: ФЭК, Vero-V, ПСКГ-30, Taurus-4, MARC-145 уже на первом пассаже. Наиболее высокий уровень накопления вируса наблюдали в клеточной культуре ФЭК при дозе заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. и времени культивирования 72–96 часов.

Ключевые слова: реовирусный теносиновиит, штамм «ARV04/02», клеточные культуры, культивирование реовируса.

UDC 619:616.72-002-022.6:636.52/58:57.082.26

# CULTIVATION OF AVIAN REOVIRUS ARV04/02 STRAIN IN DIFFERENT CELL CULTURES

M.N. Mitrofanova<sup>1</sup>, L.V. Malakhova<sup>2</sup>, B.L. Manin<sup>3</sup>

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

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

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

## SUMMARY

The paper demonstrates data on experimental cultivation of avian reovirus tenosynovitis agent in different cell cultures. It was indicated that strain ARV04/02 was capable of reproduction in all tested cell cultures (CEF, Vero-V, PSKG-30, Taurus-4, MARC-145) at the first passage already. The highest level of the virus accumulation was observed in CEF culture at the infection dose of 0.1 TCID<sub>50</sub>/cell and during 72-96 hours of cultivation.

Key words: reovirus tenosynovitis, ARV04/02, cell cultures, reovirus cultivation.



**ВВЕДЕНИЕ**

Реовирусный теносиновит птиц является одним из основных опасных заболеваний, наносящих значительный экономический ущерб мировому промышленному птицеводству [2, 3]. Эпизоотическая ситуация в России сложилась так, что реовирусный теносиновит птиц с середины 90-х годов XX века регистрируется повсеместно [1]. Экономические потери при данном заболевании связаны с низкой продуктивностью особей, снижением категорийности тушек, повышенной выбраковкой, уменьшением яйценоскости на 6–20% и гибелью птиц. При этом повышаются расходы на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий в хозяйствах, неэффективно используется корм [2]. Основным способом профилактики заболевания реовирусным теносиновитом является вакцинация цыплят, молодняка и родительского стада живыми и инактивированными препаратами [3].

Одним из ключевых этапов разработки технологии изготовления качественных и эффективных вакцин против реовирусного теносиновита кур является выбор системы культивирования для репродукции вируса, обеспечивающей получение препарата с высокой протективной и антигенной активностью [4]. Обычно для получения реовируса применяется естественная система культивирования — первично трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) [6]. Как правило, реовирус обнаруживается в культуре клеток ФЭК с наличием четко выраженного цитопатического действия (ЦПД) уже на третьи сутки. Данная культура считается наиболее оптимальной для репродукции реовируса [5, 9]. Также существует возможность адаптации реовируса к перевиваемым клеточным линиям для получения антигена. Так как доступных для промышленного выращивания перевиваемых клеточных линий птичьего происхождения очень мало, используются постоянные культуры разных млекопитающих (обезьян, свиней и КРС) [7, 8].

Целью данной работы явился подбор наиболее чувствительной культуры клеток для репродукции штамма «ARV04/02» реовируса птиц и отработка оптимальных условий его культивирования.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

*Вирус.* Реовирус птиц, штамм «ARV04/02» (штамм ФГБУ «ВНИИЗЖ»), адаптированный к первичной культуре клеток ФЭК (5 пассаж), с инфекционной активностью 5,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>; реовирус птиц, вакцинный штамм «1133», 4 пассаж ФЭК с инфекционной активностью 6,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

*Культуры клеток.* Для культивирования реовируса птиц и определения его инфекционной активности использовали первично трипсинизированную культуру клеток ФЭК. Первичную культуру клеток ФЭК готовили из 10–12-суточных эмбрионов СПФ-кур фирмы Lohmann (Германия).

Посевная концентрация клеток ФЭК составляла: для пенициллиновых флаконов — 400–500 тыс/см<sup>3</sup>, для клинских матрасов — 200–300 тыс/см<sup>3</sup>, для роллерных сосудов — 1,2–1,5 млн кл/см<sup>3</sup>.

Также в работе использовали перевиваемые культуры клеток: Vero-V (почка африканской зелёной мартышки), ПСГК-30 (почка сибирского горного козорога), Taurus-4 (почка телёнка), MARC-145 (почка макаки-резус).

После инокуляции культуры клеток выращивали до стадии хорошо сформированного монослоя без признаков дегенерации. Перевиваемые культуры высеивали во все перечисленные сосуды в концентрации 120–150 тыс. клеток в см<sup>3</sup>. Вирус вносили после формирования конфлюэнтного монослоя.

*Питательные среды и растворы.* В качестве росто-вой питательной среды использовали синтетическую питательную среду ПСП с 10% сывороткой крови КРС (рН 7,0–7,1).

В качестве поддерживающей среды использовали также питательную среду ПСП с 2% инактивированной сывороткой КРС (рН 7,3–7,5).

Монослой культуры клеток отмывали солевым раствором Хенкса (рН 7,1–7,2).

Трипсинизацию куриных эмбрионов проводили 0,25% раствором трипсина (рН 7,5).

Полученный реовирус птиц титровали в пенициллиновых флаконах на гомологичных культурах клеток методом последовательных 10-кратных разведений. Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

На первом этапе работы проводили адаптацию реовируса птиц штамма «ARV04/02» к различным культурам клеток и определяли наиболее чувствительную и эффективную клеточную систему для его репродукции. В процессе скрининга были использованы следующие клеточные линии: ФЭК, Vero-V, ПСГК-30, Taurus-4, MARC-145. Культуры клеток выращивали в 50-граммовых пластиковых матрасах в течение 2 суток. Множественность заражения составила 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. На каждой клеточной культуре было проведено пять пассажей. На всех пассажных уровнях каждые 24 часа наблюдали проявление ЦПД в клеточном монослое. Съём вируса проводили при 80–90% поражении монослоя клеток. Вирусосодержащий материал каждого пассажа титровали на культуре клеток ФЭК.

Уже на 1 пассаже во всех культурах клеток наблюдалось ЦПД вируса, наиболее четко выраженное в клеточных линиях ФЭК и Vero-V. Картина ЦПД была различной. В культуре клеток ФЭК, монослой которой представлен в основном веретенообразными клетками, наблюдалось округление клеток и отслоение их от стекла, в культуре Vero-V — образование большого количества конгломератов, в культуре Taurus-4 — появление «окон» в монослое и разрушение клеток, в культуре MARC-145 — образование округлых клеток и слияние их границ с образованием симпластов. Во всех клеточных линиях, кроме ПСГК-30, в процессе пассирования отмечали постепенное накопление вируса. Наиболее стабильное и последовательное увеличение титра к 5 пассажу наблюдали при репродукции реовируса в культурах клеток ФЭК и Vero-V: 5,67±0,14 и 5,08±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно, титр вируса в культурах клеток MARC-145 и Taurus-4 был значительно ниже и составлял 3,75±0,00 и 4,33±0,18 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что динамика и уровень накопления вируса в клеточных культурах были неодинаковы. Так, в клеточной культуре ФЭК с 1 пассажа титр был значительно выше, чем в клетках ПСГК, MARC-145 и Taurus-4.

**Таблица 1**  
Уровень накопления реовируса птиц штамма «ARV04/02» в стационарных клеточных культурах

Вид культуры клеток	Уровень накопления вируса, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>				
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
ФЭК	5,33±0,18	5,25±0,00	5,33±0,18	5,58±0,14	5,67±0,14
Vero-V	4,58±0,14	4,33±0,18	4,67±0,14	4,67±0,14	5,08±0,14
ПСГК-30	3,33±0,18	3,58±0,14	3,25±0,25	3,08±0,14	3,33±0,18
Taurus-4	4,25±0,00	3,75±0,25	3,33±0,18	4,00±0,00	4,33±0,18
MARC-145	3,08±0,14	3,33±0,18	3,75±0,25	4,25±0,25	3,75±0,00

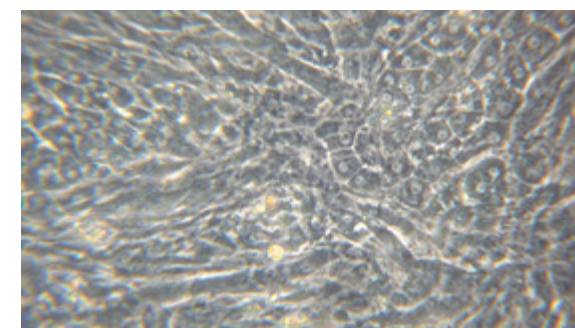


Рис. 1. Нормальная морфология клеточной культуры ФЭК (контроль, объектив ×40)

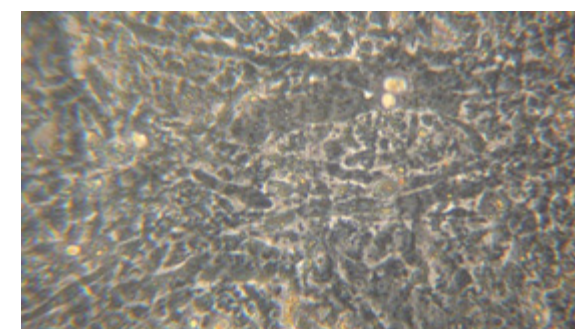


Рис. 2. ЦПД вируса в клетках через 24 часа культивирования (объектив ×40)

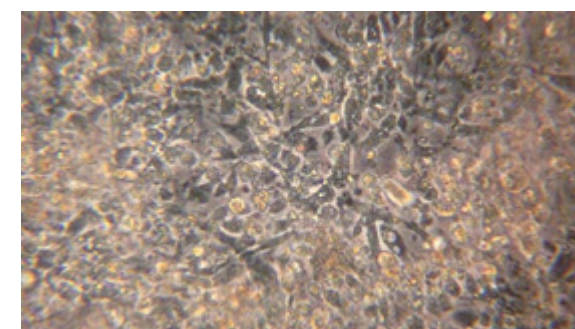


Рис. 4. ЦПД вируса в клетках через 72 часа культивирования (объектив ×40)

Титр вируса в культуре клеток Vero-V также находился на достаточно высоком уровне и увеличился к 5 пассажу на 0,5 логарифма.

Динамика цитопатических изменений в культуре клеток ФЭК, инфицированных реовирусом птиц штамм «ARV04/02», представлена на рис. 1–5.

Следующим этапом исследований являлось определение множественности заражения и времени культивирования реовируса птиц штамма «ARV04/02». Использовали дозу заражения 1,0; 0,1 и 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Патологические изменения в клетках ФЭК учитывали через каждые 24 часа. Сбор вируса производился при

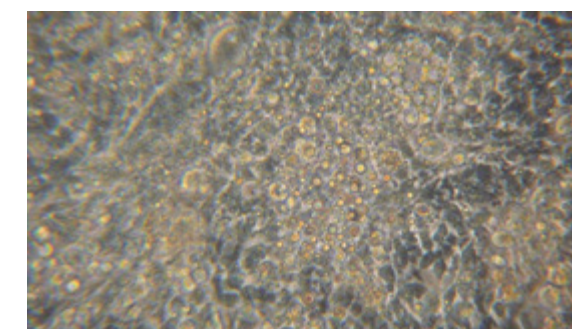


Рис. 3. ЦПД вируса в клетках через 48 часов культивирования (объектив ×40)

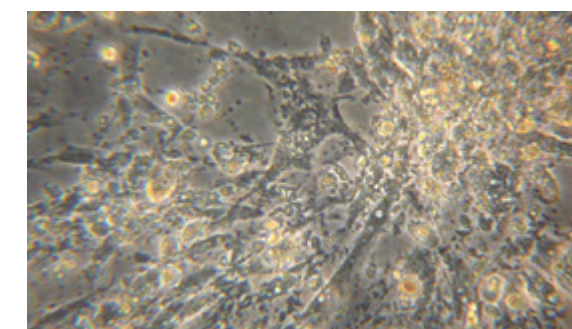


Рис. 5. ЦПД вируса в клетках через 96 часов культивирования (объектив ×40)

Таблица 2

Влияние множественности заражения и времени культивирования реовируса птиц в культуре клеток ФЭК

Время культивирования, ч	Уровень накопления вируса, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>		
	0,01 ТЦД <sub>50</sub> /кл	0,1 ТЦД <sub>50</sub> /кл	1,0 ТЦД <sub>50</sub> /кл
24	3,67±0,14	4,08±0,14	4,75±0,00
48	4,08±0,14	5,08±0,14	5,33±0,18
72	4,33±0,18	5,33±0,18	5,08±0,14
96	4,67±0,14	5,67±0,14	5,08±0,14

полном разрушении клеток. Активность вируса определяли методом титрования на культуре клеток ФЭК. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Из таблицы видно, что при использовании дозы заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл отмечали наиболее высокое накопление вируса. С увеличением срока культивирования реовируса его инфекционная активность повышалась и достигала максимума к 96 часам, титр вируса составил 5,67±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, в то время как при множественности заражения 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл титр вируса к 96 часам составил 4,67±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, а при 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл — 5,08±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы и анализа полученных данных установлено, что штамм реовируса птиц «ARV04/02» способен к репродукции во всех исследуемых линиях клеток: ФЭК, Vero-V, ПСКГ-30, Taurus-4, MARC-145 уже на первом пассаже. Однако в клеточной культуре ФЭК уровень накопления вируса был значительно выше, чем в остальных перевиваемых линиях, и находился на уровне 5,67±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Наиболее оптимальным для данного штамма является время культивирования 72–96 часов при дозе заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Титр вируса в культуре клеток Vero-V также находился на достаточно высоком уровне и составил к пятому пасажу 5,08±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Таким образом, культуры клеток ФЭК и Vero-V могут быть рекомендованы для культивирования и титрования реовируса птиц штамма «ARV04/02».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: материалы 54-й межвузовской науч.-практ. конф., Кострома, 6–7 февраля 2003 г. — Кострома, 2003. — 63 с.
2. Алиев А.С. Реовирусная инфекция птиц // Ветеринария с/х животных. — 2005. — № 12. — С. 28–33.
3. Пругло В.В., Трефилов Б.Б. Реовирусные инфекции птиц // Ветеринария в птицеводстве. — 2006. — № 5. — С. 31–35.
4. Сергеев В.А. Вирусные вакцины: монограф. — Киев: Урожай, 1993. — 368 с.
5. Состояние и перспективы развития научных исследований по профилактике и лечению болезней с/х животных и птиц: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодарской НИВС. — Ч. 1. — Краснодар, 1996. — С. 62–63.
6. Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Т. 3. — Владимир, 2005. — 400 с.
7. A comparison of avian mammalian cell cultures for the propagation of avian reovirus WVU 2937 / V. Barta, W.T. Springer, D.L. Millar // Avian Dis. — 1984. — Vol. 28, N 1. — P. 216–223.
8. Adaptation and characteristics of replication of a strain of avian reovirus in vero cells / G.E. Wilcox, M.D. Robertson, A.D. Lines // Avian Pathol. — 1985. — Vol. 14. — P. 321–328.
9. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chicken / A.A.W.M. van Loon, H.C. Koopman, W. Kosman [et al.] // Vet. Quart. — Vol. 23, №3. — 2001. — P. 129–133.

## ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ

### Вакцину для профилактики болезни Марека «Маривак 1+3»

Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является отечественным аналогом зарубежных вакцин против болезни Марека из 1 и 3 серотипов вируса, содержащего 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 высоко вирулентных (vv) и высоко

вирулентных (vv+) штаммов вируса БМ и может успешно использоваться 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.

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.

#### 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

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

## СРАВНЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ИЗОЛЯТАМИ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ ПОДТИПОВ А И В

П.С. Ярославцева<sup>1</sup>, М.А. Волкова<sup>2</sup>, З.Б. Никонова<sup>3</sup>, Н.С. Мудрак<sup>4</sup>, Ир.А. Чвала<sup>5</sup>

<sup>1</sup> младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yaroslavtseva@arriah.ru

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

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

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

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

### РЕЗЮМЕ

При экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятом метапневмовируса птиц подтипа А отмечали слабо выраженные клинические признаки с 6 по 14 сутки после заражения. У инфицированных цыплят отмечали незначительное повышение активности Т-хелперов в крови, слабо выраженный специфический гуморальный иммунный ответ, выработку специфических секреторных антител. Изолят метапневмовируса птиц подтипа В вызывал несколько более выраженные по сравнению с подтипом А клинические проявления у цыплят с 5 по 15 сутки после инфицирования, однако в обоих экспериментах клинические признаки полностью исчезали через 14–15 суток после заражения. У зараженных цыплят отмечали увеличение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови и селезенке, специфический гуморальный иммунный ответ у 50–70% птиц, активацию локального иммунного ответа у 50% цыплят.

Ключевые слова: метапневмовирус птиц, иммунный ответ, экспериментальное заражение.

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

## COMPARISON OF IMMUNE RESPONSE IN BROILER CHICKENS AFTER EXPERIMENTAL INOCULATION WITH ISOLATES OF AVIAN METAPNEUMOVIRUS SUBTYPES A AND B

P.S. Yaroslavtseva<sup>1</sup>, M.A. Volkova<sup>2</sup>, Z.B. Nikonova<sup>3</sup>, N.S. Mudrak<sup>4</sup>, Ir.A. Chvala<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yaroslavtseva@arriah.ru

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

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

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

<sup>5</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala\_ia@arriah.ru

### SUMMARY

After experimental inoculation of broiler chickens with subtype A avian metapneumovirus isolate, mild clinical signs were observed on days 6–14 after inoculation. The infected chickens demonstrated slight increase of T-helpers activity in blood, poor specific antibody response, development of specific secretory antibodies. Subtype B avian metapneumovirus isolate caused a somewhat more obvious specific clinical signs in chickens compared with subtype A on days 5–15 after inoculation, however, in both experiments, clinical signs completely disappeared in 14–15 days after infection. The increase of relative number of cytotoxic T lymphocytes in blood and in spleen, specific antibody response in 50–70% of chickens and activation of local immune response in 50% of chickens were observed in inoculated chickens.

Key words: avian metapneumovirus, immune response, experimental inoculation.

**ВВЕДЕНИЕ**

Метапневмовирус (МПВ) птиц — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*, род *Metapneumovirus*, вид *Avian Metapneumovirus* (aMPV). Впервые он был выявлен в 1978 г. в Южной Африке. МПВ птиц является возбудителем контагиозного респираторного заболевания кур и индеек всех возрастов, которое представляет серьезную угрозу для промышленного птицеводства во всем мире и наносит значительный экономический ущерб. Поскольку исходным звеном локализации и развития инфекционного процесса при МПВ птиц являются дыхательные пути, локальный и клеточный иммунный ответ предотвращает репликацию и дальнейшее проникновение вируса в организм [2–6].

На основании антигенных и генетических различий выделяют 4 подтипа вируса: А, В, С и D. Вирусы подтипов А и В были выявлены в Африке, Азии, Южной и Северной Америке, Европе, России. Подтип С был впервые выделен от индеек с респираторными признаками болезни в США в 1996 г., а позднее во Франции, Южной Корее и Китае. Вирус подтипа D — во Франции и Корее [2, 3]. На территории Российской Федерации за последние 10 лет выявляли МПВ птиц подтипов А и В [1]. По данным исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ» за 2015 г., геном МПВ птиц был выявлен в 15% исследованных птицефабрик страны.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка иммунного ответа кур на заражение изолятами МПВ птиц подтипов А и В, выделенными на территории РФ.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Вирусы.** Изолят МПВ птиц подтипа А (aMPV/A/02/2014), выделенный из патологического материала от 6-месячных кур яичного направления одной из птицефабрик Костромской области РФ в 2014 г.

Изолят МПВ птиц подтипа В (aMPV/B/22/2010), выделенный из патологического материала от 29-суточных цыплят-бройлеров одной из птицефабрик Белгородской области в 2010 г.

**Эксперимент на цыплятах.** Проводили два экспериментальных заражения МПВ птиц подтипов А и В. В обоих экспериментах использовали 7-суточных цыплят-бройлеров, не имеющих антител к МПВ птиц. Цыплят делили на опытные и контрольные группы по 20 голов в каждой, которые содержали в отдельных изолированных боксах. Опытной группе вводили вирусный материал интраназально и закапыванием на конъюнктиву глаза в дозе 6,1 Iг ТЦД<sub>50</sub>/0,4 мл на цыплёнка. В ходе экспериментов отбирали пробы (кровь, ротоглоточные смывы, слезная жидкость, тимус, селезенка, бурса) для исследования методами ИФА и проточной цитофлуориметрии.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Выявление антител к МПВ птиц проводили с использованием набора для определения антител к метапневмовирусу птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении (ФГБУ «ВНИИЗЖ») согласно инструкции производителя. Учёт реакции проводили на спектрофотометре-ридере Sunrise Basic (Tecan, Австрия) при длине волны 405 нм с использованием компьютерной программы «СИНКО-ИФА». 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), сенсибилизированных антигеном МПВ птиц в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5), по стандартному протоколу. Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

**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.

**Определение продукции цитокинов.** Суспензию лимфоцитов селезенки в концентрации 1×10<sup>7</sup> клеток/мл активировали конкавалином А (Кон А) (Sigma-Aldrich, США) (0,1 мг/мл) и инкубировали в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 48 ч. В качестве отрицательного контроля использовали лимфоциты, инкубированные со средой RPMI 1650. Продукция интерферона-γ (IFN-γ) была оценена в ИФА с использованием набора Chicken IFN-γ CytoSet (Biosource, США).

**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**

В ходе эксперимента у цыплят опытных групп наблюдали клинические признаки, характерные для респираторных заболеваний. У цыплят, зараженных изолятом подтипа А, наблюдали носовые истечения и незначительное опухание инфраорбитальных синусов с 6 по 14 сутки после инфицирования. У цыплят, зараженных изолятом подтипа В, клинические признаки, которые регистрировали с 5 по 15 сутки после инфицирования, были более выражены: наблюдали кратковременное угнетенное состояние, носовые истечения, одностороннее либо двустороннее опухание инфраорбитальных синусов. У птиц контрольных групп клинических изменений не наблюдали.

Сыворотки крови отбирали от птиц опытных и контрольных групп и исследовали в ИФА на наличие специфических антител к МПВ птиц подтипов А и В. Низкий уровень специфических антител к МПВ подтипа А был выявлен у 2 из 10 исследованных цыплят опытной группы через 7 и 14 суток после заражения (максимальное значение титра выявленных антител в ИФА составляло 690). Специфические антитела к вирусу подтипа В выявляли у 7, 5 и 6 цыплят из опытной

Таблица  
Результаты выявления антител к МПВ птиц в сыворотках крови в ИФА

Группа	Сутки после заражения				
	0	7	14	21	28
Контроль		198±35 0/5	138±56 0/5	145±64 0/5	173±69 0/5
Опыт (МПВ птиц подтипа А)	234±111 <sup>а</sup> 0/5 <sup>с</sup>	221±83 686±4 <sup>б</sup> 2/10	187±49 457±3 2/10	129±18 0/10	106±23 0/7
Контроль		281±52 0/6	199±50 0/6	190±49 0/6	не исследовали
Опыт (МПВ птиц подтипа В)	266±56 <sup>а</sup> 0/6 <sup>с</sup>	576±174 758±215 <sup>б</sup> 7/10	1195±604 2288±1022 5/10	1732±861 2832±1272 6/10	не исследовали

<sup>а</sup> средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

<sup>б</sup> средний положительный титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

<sup>с</sup> отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб.

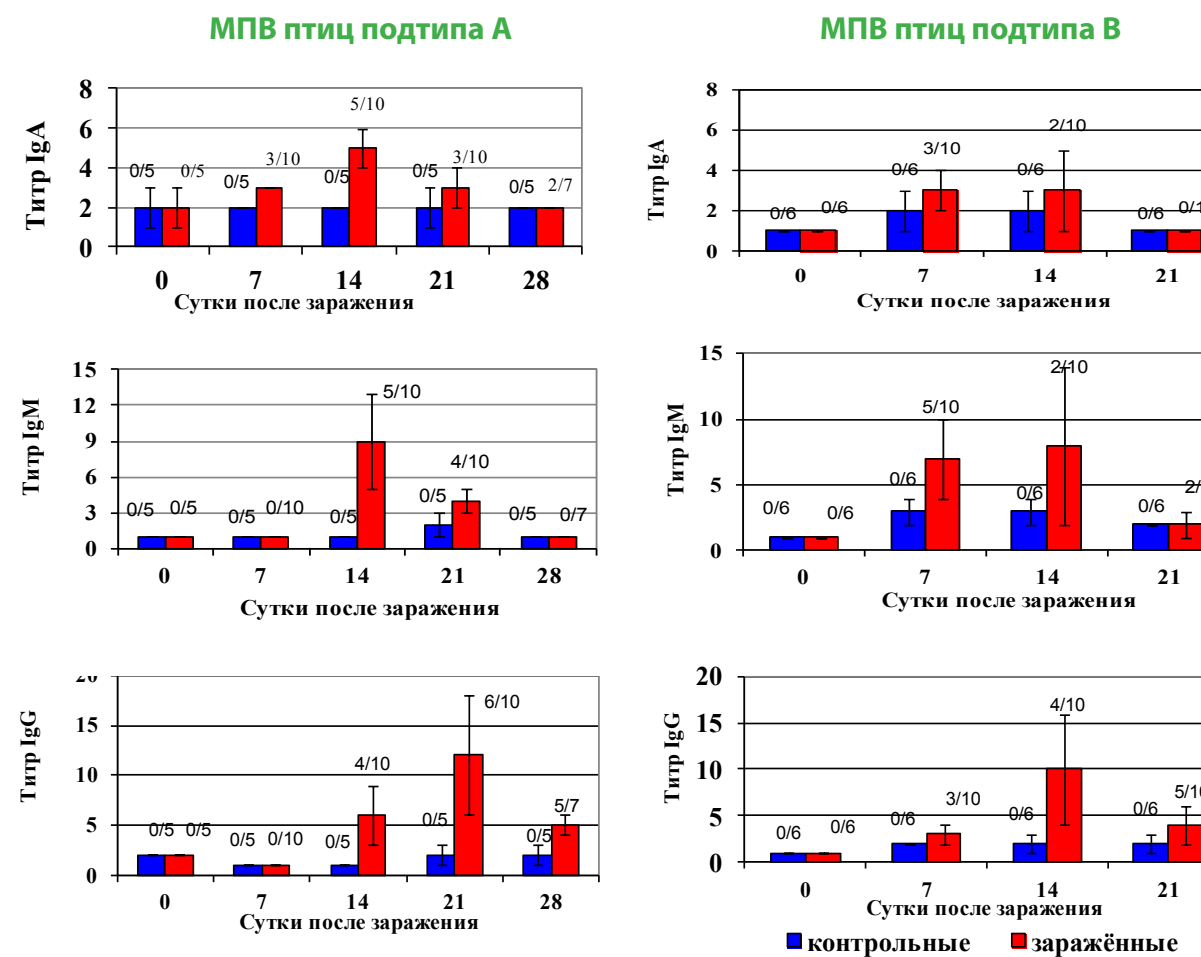


Рис. 1. Результаты выявления антител к МПВ птиц подтипов А и В в ротоглоточных смывах цыплят опытных и контрольных групп

Результат реакции считали положительным при величине титра антител 1:4 и выше. 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.

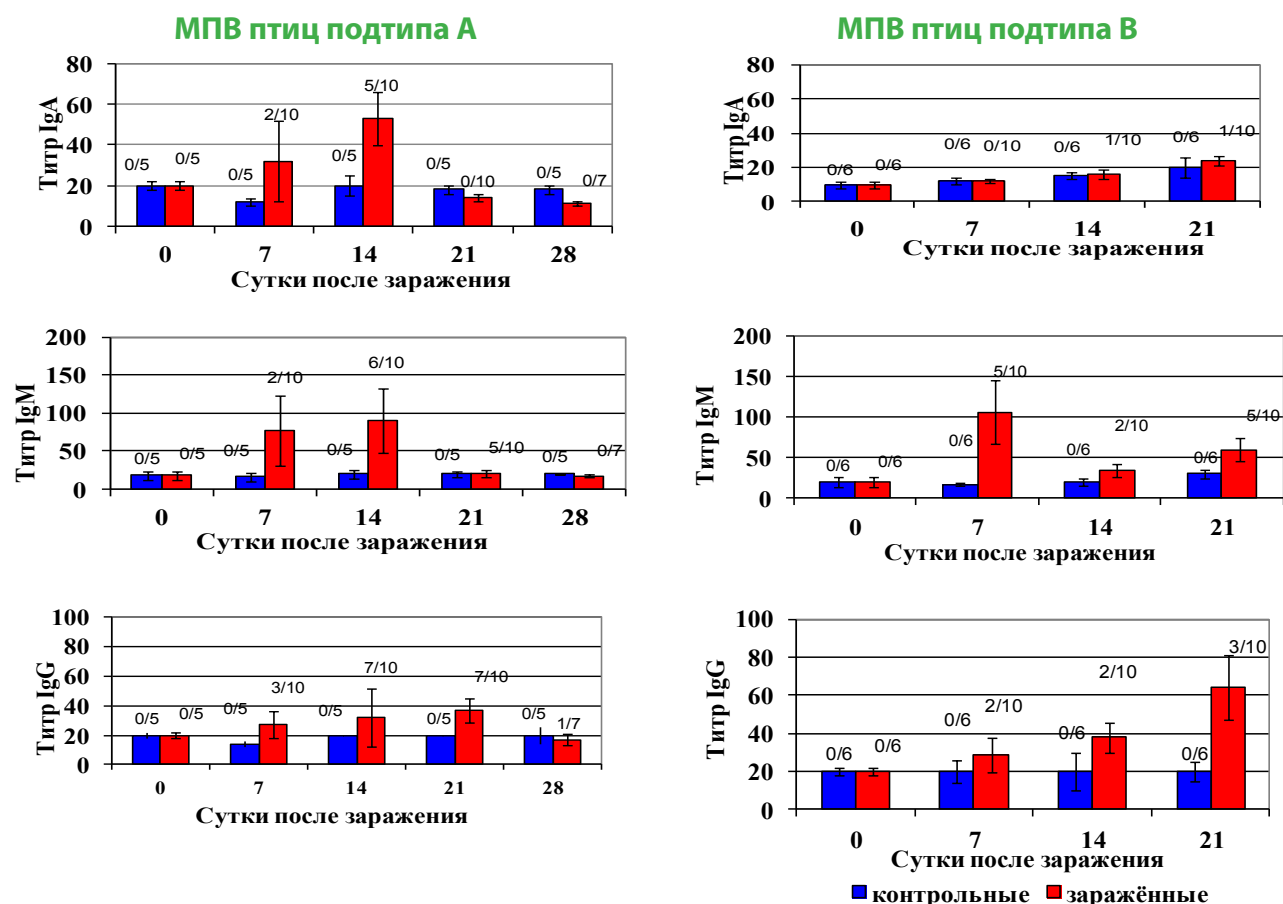


Рис. 2. Результаты выявления антител к МПВ птиц подтипов А и В в слезной жидкости инфицированных и контрольных групп цыплят

Результат реакции считали положительным при величине титра антител 1:20 и выше. 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.

группы, соответственно на 7, 14 и 21 сутки. У цыплят контрольных групп специфические антитела к МПВ птиц обоих подтипов не выявляли (таблица).

При исследовании ротоглоточных смывов у цыплят, зараженных вирусом подтипа А, пик выработки специфических антител классов А и М регистрировали на 14 сутки, а пик выработки антител класса G — на 21 сутки после заражения. У цыплят, зараженных вирусом подтипа В, пик выработки специфических антител регистрировали в более ранние сроки: антитела классов А и М выявляли уже начиная с 7 суток, антитела класса G — с 14 суток после инфицирования (рис. 1).

При исследовании слезной жидкости от цыплят, зараженных вирусом подтипа А, специфические антитела классов А и М в наиболее высоких титрах выявляли на 14 сутки после инфицирования. У цыплят, зараженных вирусом подтипа В, специфические антитела класса А выявляли в низких титрах, незначительно отличающихся от контрольной группы, антитела класса М в наиболее высоких титрах регистрировали на 7 сутки после инфицирования. Пик выработки антител

класса G отмечали одинаково для подтипов А и В на 21 сутки (рис. 2).

У цыплят контрольных групп специфические антитела к МПВ птиц в ротоглоточных смывах и слезной жидкости не обнаруживали.

Для оценки параметров клеточного иммунного ответа определяли количественное соотношение различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, а также оценивали функциональную активность лимфоцитов селезенки.

При экспериментальном заражении вирусом подтипа А через сутки после инфицирования регистрировали увеличенный уровень Т-хелперов (CD4) в крови и увеличенный объем цитотоксических клеток в тимусе инфицированных цыплят по сравнению с неинфицированным контролем. В бурсе инфицированных цыплят отмечали статистически значимое уменьшение относительного количества В-лимфоцитов (Bu1a), по сравнению с незараженными цыплятами через 1, 10 и 21 сутки после заражения, и увеличение относительного количества Т-лимфоцитов с 3 по 10 сутки после заражения (рис. 3).

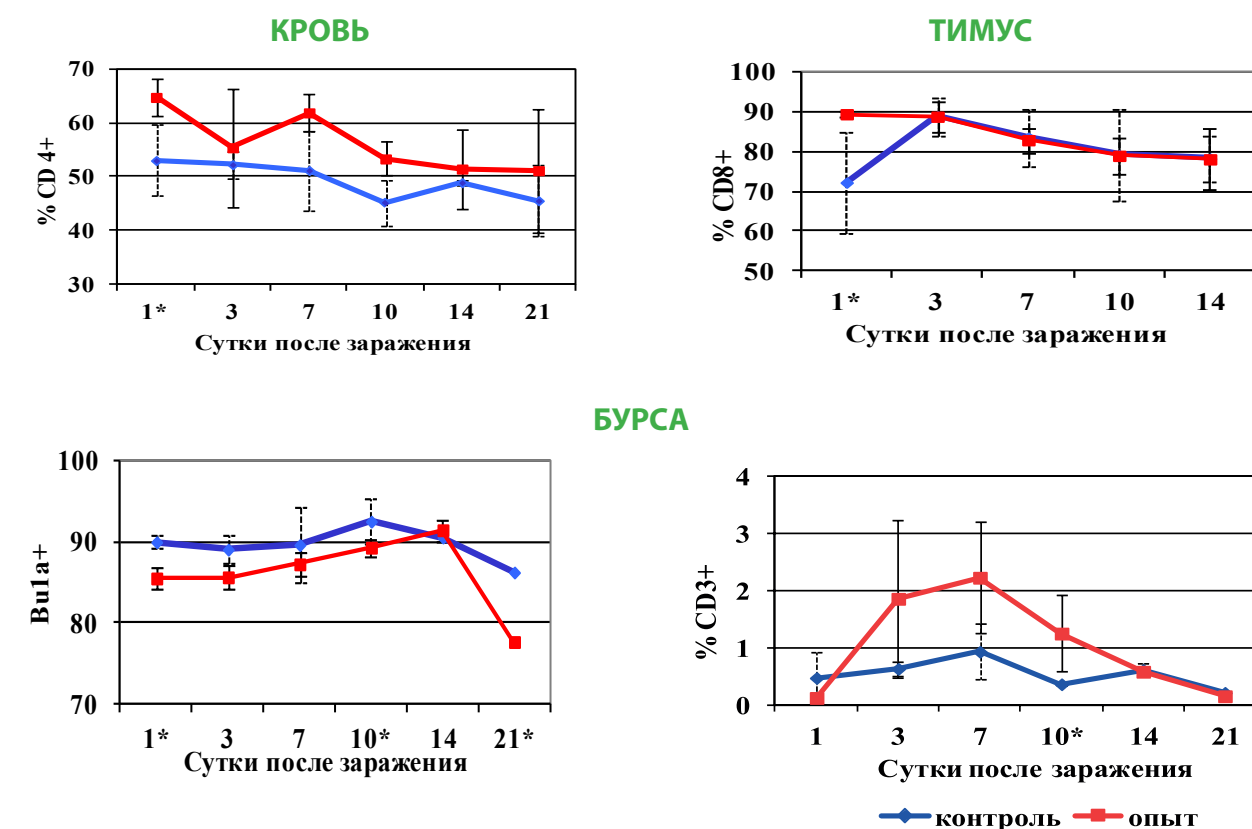


Рис. 3. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц подтипа А

\* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы,  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-тест.

Вирус подтипа В вызывал увеличение относительного количества цитотоксических лимфоцитов (CD8) в крови и селезенке зараженных цыплят по сравнению с неинфицированными, в бурсе отмечали снижение общего объема лимфоцитов (CD45+) на 12 сутки после заражения (рис. 4).

При определении продукции IFN-γ в супернатанте активированных Кон А лимфоцитов селезенки цыплят, зараженных вирусом подтипа А, регистрировали увеличение продукции IFN-γ на 14 сутки после инфицирования и затем ее снижение на 21 сутки; у цыплят, зараженных вирусом подтипа В, увеличение уровня продукции IFN-γ отмечали в более поздние сроки, через 20 суток после инфицирования (рис. 5).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятами МПВ птиц отмечали незначительные проявления клинических признаков, характерных для респираторных заболеваний, которые были более выражены при заражении МПВ подтипа В.

В обоих экспериментах наблюдали активацию локального иммунного ответа с 7 суток после заражения, клинические признаки регистрировали в период с 5–6 до 14–15 суток после заражения, а затем наблюдали полное выздоровление цыплят-бройлеров.

Динамика выработки гуморальных антител коррелировала со временем прекращения клинических признаков, однако изолят подтипа А вызывал незначительное увеличение титров специфических антител в крови только 20% зараженных птиц, в то время как антитела к подтипу В выявляли у 50–70% инфицированных цыплят и в более высоких титрах.

Клеточный иммунный ответ у цыплят, зараженных изолятом МПВ птиц подтипа В, характеризовался увеличением относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови и селезенке, а также увеличением уровня продукции IFN-γ в супернатанте активированных Кон А лимфоцитов селезенки цыплят на 20 сутки после инфицирования. При заражении вирусом подтипа А отмечали увеличение относительного количества хелперов в крови в первые сутки после заражения и снижение продукции IFN-γ на 21 сутки. Инфицирование МПВ птиц также вызывало снижение общего количества лимфоцитов в бурсе.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никонова З.Б., Перевозчикова Н.А., Зиняков Н.Г. Филогенетический анализ изолятов метапневмовирусов птиц, выявленных в России и странах ближнего зарубежья в 2005–2011 гг. // Ветеринария и кормление. — 2012. — № 5. — С. 34–36.

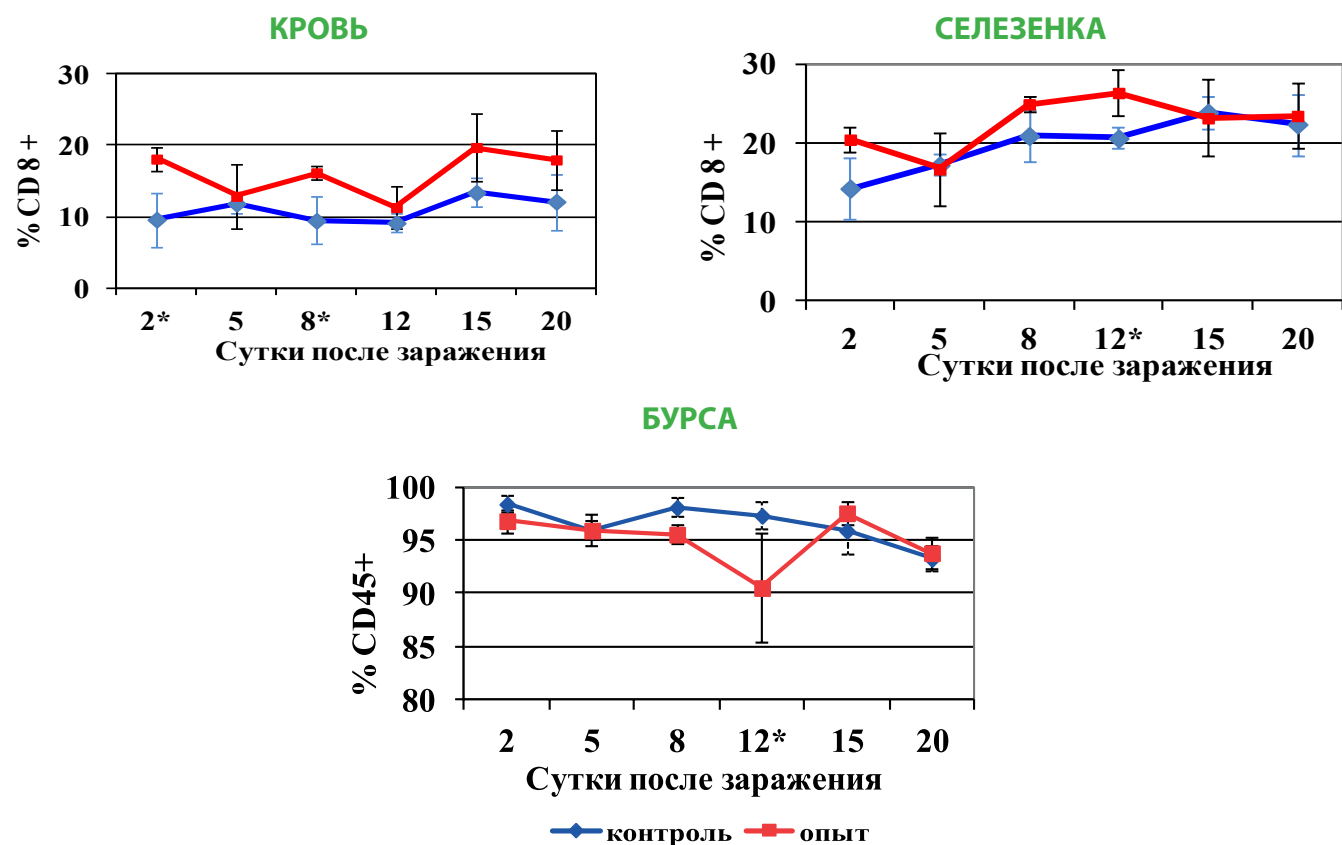


Рис. 4. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц подтипа В

\* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы,  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test.

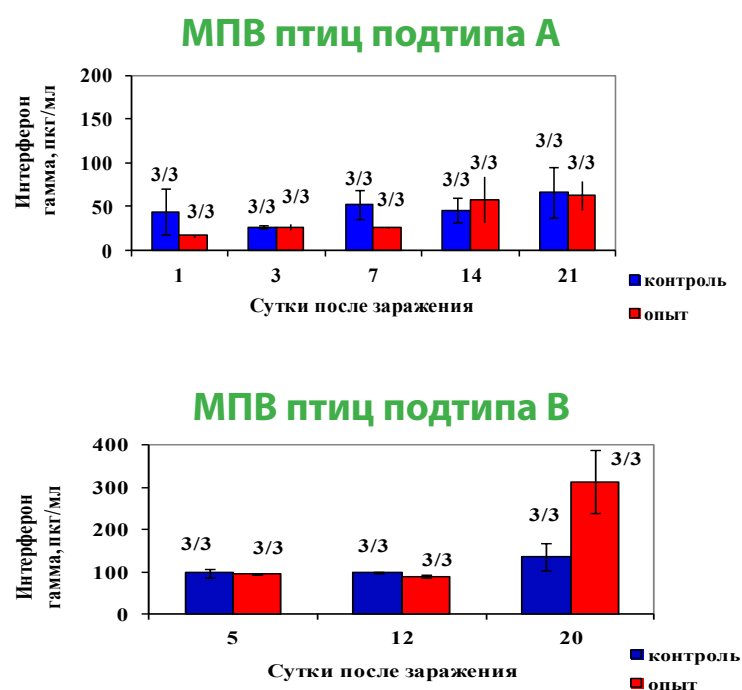


Рис. 5. Экспрессия IFN-γ спленоцитами цыплят, стимулированных Кон А, в различные сроки после заражения изолятами МПВ птиц

- Cook J.K.A. Avian rhinotracheitis // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2000. — Vol. 19, № 2. — P. 602–613.
- Hartmann S., Sid H., Rautenklein S. Avian metapneumovirus infection of chicken and turkey tracheal organ cultures: comparison of virus-host interactions // Avian Pathol. — 2015. — Vol. 44, № 6. — P. 480–489.
- Immune responses and interactions following simultaneous application of live Newcastle disease, infectious bronchitis and avian metapneumovirus vaccines in specific-pathogen-free chicks / F. Awad, A. Forrester, M. Baylis [et al.] // Res. Vet. Sci. — 2015. — Vol. 98. — P. 127–133.
- 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, № 21. — P. 12348–12363.
- 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.

УДК 619:616.98:578.832.1:636.52/.58

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1, ВЫЗВАВШЕГО ВСПЫШКИ БОЛЕЗНИ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ В 2014 Г.

И.А. Чвала<sup>1</sup>, А.В. Андриясов<sup>2</sup>, Н.Г. Зиняков<sup>3</sup>, Д.А. Алтунин<sup>4</sup>, В.Ю. Сосипаторова<sup>5</sup>

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

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

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

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

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

### РЕЗЮМЕ

В сентябре 2014 г. в населенных пунктах Алтайского края в стадах домашних птиц зарегистрированы вспышки острой инфекции с высокой смертностью. В результате лабораторных исследований были выделены и идентифицированы вирусы высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1. Проведено изучение молекулярно-биологических свойств вируса, описаны характерные клинические признаки и патоморфологические изменения, особенности инфекции у цыплят.

Ключевые слова: грипп птиц, сайт нарезания, ген, гемагглютинин, вирулентность, индекс патогенности.

UDC 619:616.98:578.832.1:636.52/.58

## ISOLATION AND EXAMINATION OF A/H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS THAT CAUSED DISEASE OUTBREAKS IN ALTAI KRAI IN 2014

I.A. Chvala<sup>1</sup>, A.V. Andriyasov<sup>2</sup>, N.G. Zinyakov<sup>3</sup>, D.A. Altunin<sup>4</sup>, V.Yu. Sosipatorova<sup>5</sup>

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

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

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

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

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

### SUMMARY

In September, 2014 outbreaks of highly acute infection resulting in high mortality were reported in poultry flocks in some settlements of the Altai Krai. Laboratory tests allowed isolation and identification of highly pathogenic A/H5N1 avian influenza virus. Molecular and biological properties of the virus were examined; typical clinical signs, post-mortem lesions and disease character in chicks were described.

Key words: avian influenza, cleavage site, gene, hemagglutinin, virulence, pathogenicity index.

**ВВЕДЕНИЕ**

Эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу остается напряженной в ряде регионов мира. Вспышки болезни, вызванные вирусом подтипа A/H5N1 генетической линии A/Goose/Guangdong/96 (A/Gs/Gd/96), в 2014–2015 гг. были зарегистрированы среди диких и сельскохозяйственных птиц в странах Азии, Африки и Европы. Особое беспокойство ветеринарных служб вызвала реассортация и распространение в Юго-Восточной Азии вирусов подтипов A/H5N2, A/H5N6 и A/H5N8, причем последний был занесен в страны Европы и Северной Америки. В большинстве случаев источник инфекции не определен, однако при расследовании отдельных вспышек указано на участие диких птиц в заносе инфекции в стада сельскохозяйственных птиц и распространении болезни в другие страны и регионы мира [11].

В июле 2005 г. на территории Новосибирской области Российской Федерации были зарегистрированы первые случаи высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП) A/H5N1 среди диких и сельскохозяйственных птиц, сопровождавшиеся острым течением и высокой смертностью. В период с июля по август вспышки болезни были зафиксированы в Алтайском крае, Омской, Тюменской областях, а затем и в других субъектах страны. В результате лабораторных исследований было установлено, что возбудителем болезни является вирус, относящийся к генетической сублинии Qinghai (клада 2.2), сформировавшейся весной–летом 2005 г. на северо-западе Китая. Начиная с 2008 г. вспышки ВПГП A/H5N1 на территории России были вызваны вирусом клады 2.3.2 [3, 6, 8, 11]. Вспышки гриппа в популяциях диких птиц на озере Убсу-Нур Республики Тыва в 2006, 2009 и 2010 гг. указывают на значимость Сибири в эпизоотологии высокопатогенного гриппа A/H5N1 [3, 5, 6, 10]. Через территорию региона пролегают миграционные пути диких птиц, в том числе из Юго-Восточной Азии, неблагоприятной по ряду инфекционных болезней, кроме того, обилие водных ресурсов, места остановок и гнездований предполагают возможность новых заносов и распространения болезней на территории России.

Целью данной работы являлось изучение биологических свойств вируса гриппа A/H5N1, выявленного при вспышках острой болезни на частных подворьях Алтайского края в 2014 г.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Выделение вируса.** Вирусовыделение проводили в развивающихся 10-суточных, свободных от патогенной микрофлоры (СПФ) куриных эмбрионах (КЭ) [7]. Из патологического материала (проба внутренних органов) готовили 10–20% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4), центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g, добавляли антибиотики (100 Ед/мл бензилпенициллина натриевую соль, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата) и 50 Ед/мл нистатина, выдерживали при комнатной температуре в течение часа и вводили в аллантаоисную полость КЭ в объеме 0,2 мл. Инокулированные КЭ инкубировали при 37 °С и относительной влажности 60–70%. Ежедневно эмбрионы овоскопировали и регистрировали состояние. Эмбрионы, погибшие после 24 ч инкубации и более, охлаждались в течение 12–24 ч при температуре 2–6 °С и использовались для сбора экстраэмбри-

ональной жидкости (ЭЭЖ) для проведения дальнейших исследований. Работу с КЭ проводили с использованием стерильных пробойников, шприцев, игл и с соблюдением правил при работе с вирусным материалом.

**Определение титра инфекционной активности.** Из исследуемого вирусного материала готовили ряд десятикратных последовательных разведений (от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-10</sup>). В качестве чувствительных тест-объектов использовали 10-суточные СПФ-КЭ. Каждое разведение вируса инокулировали в аллантаоисную полость чистого СПФ-КЭ. Специфичность гибели подтверждали исследованием ЭЭЖ каждого инокулированного эмбриона в реакции гемагглютинации (РГА). Титр вируса в исходном материале определяли по методу Кербера и выражали в единицах ЭИД<sub>50</sub>/мл.

**РТГА и РТНА.** Для идентификации изолятов вируса применяли реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и нейраминидазной активности (РТНА) в соответствии с общепринятыми методиками [7] с использованием антигенов и гипериммунных сывороток к вирусам гриппа производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) и Института зоофилактики (IZSve, Италия).

**Определение индекса патогенности (IVPI).** Для определения IVPI использовали общепринятую методику [10]. Исследуемую вирусосодержащую ЭЭЖ в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе вводили внутривенно десяти цыплятам в дозе 0,1 мл. За птицами вели ежедневное наблюдение в течение 10 суток и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 — птица клинически здорова; 1 — больная (отмечены некоторые признаки заболевания, такие как угнетение, отказ от корма и воды, цианоз кожи или ее производных, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 — тяжелобольная (одновременно наблюдаются несколько ярких клинических признаков инфекции); 3 — птица погибла. Погибшим птицам присваивали коэффициент 3 ежедневно, вплоть до десятых суток опыта. Индекс патогенности вычисляли по формуле:

$$IVPI = \frac{\sum_{i=1}^{10} (B_i \times 1 + TB_i \times 2 + P_i \times 3)}{10 \times N}$$

где B<sub>i</sub> – количество больных в сутки i;  
 TB<sub>i</sub> – количество тяжелобольных в сутки i;  
 P<sub>i</sub> – количество погибших в сутки i;  
 N – общее количество птиц в эксперименте.

**Гистологическое исследование.** В ходе эксперимента от павших в день гибели и незараженных (контрольных) цыплят отбирали образцы головного мозга, трахеи, легких, сердца и тонкого кишечника размером 0,5×0,5×0,5 см. Препараты фиксировали в смеси спирт-формол по Шафферу, через 48 ч осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки. С помощью ротационного микротома Microm HM340E готовили срезы тканей органов кур толщиной 5 мкм и подвергали окраске гематоксилин-эозином [2, 4].

**ПЦР.** Суммарную РНК выделяли, используя набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, кат. №74106) в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) с соответствующими

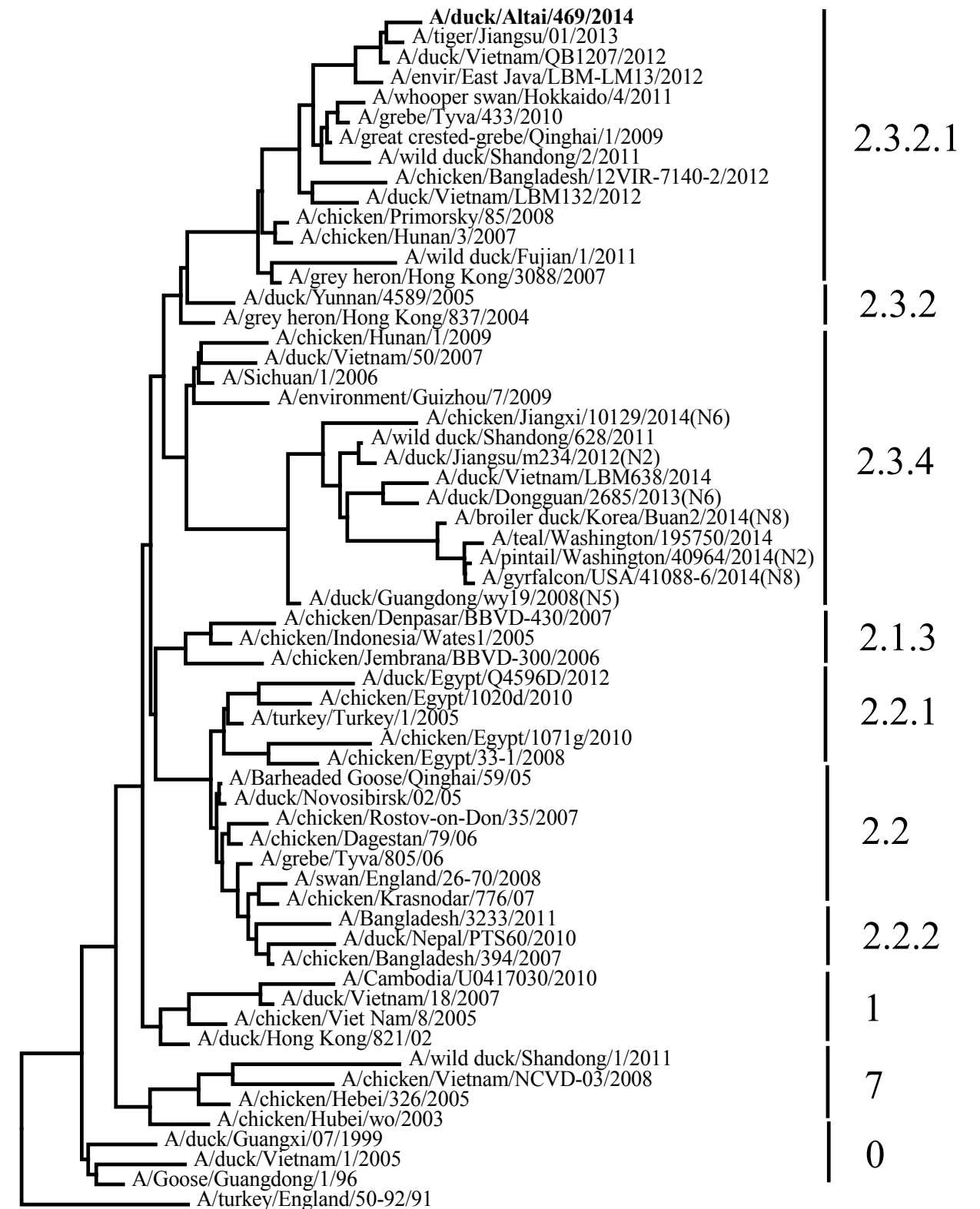


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с помощью последовательностей фрагмента (38-1704 н.п.) гена Н изолятов и штаммов вируса гриппа подтипа А/Н5

системами праймеров для выявления генома вируса гриппа птиц и идентификации подтипа H5N1 [3].

**Секвенирование.** Нуклеотидные последовательности фрагментов генов определяли с применением автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Анализ и сравнение нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей прово-

**Таблица 1**  
Аминокислотные остатки белка гемагглютинаина, определяющие рецепторную специфичность вируса гриппа

Позиция (нумерация приведена по H3-подтипу)	A/duck/Altai/469/2014 H5N1	Вирус гриппа птиц	Вирус гриппа человека
136	S	S	T
153	W	W	-
158	D	N/D	N
159	N	N	S
183	H	H	-
190	E	E	D
194	L	L	I
221	S	S	P
222	K	K	-
225	G	G/N	D
226	Q	Q	L/I
227	S	S	A
228	G	G	S

дили, используя пакет прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3. Также для сравнительного анализа использовали ранее опубликованные в международной базе GenBank последовательности изолятов и штаммов вируса гриппа птиц A/H5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/>).

Построение и редактирование филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 4.1, и графической программы Freelance Graphics.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В начале сентября 2014 г. на частных подворьях в с. Долгово и п. Ильинский Новичихинского района

Алтайского края произошел массовый падеж домашних птиц (куры, утки, гуси). Болезнь характеризовалась острым течением, гибели предшествовали отказ от корма и воды, дискоординация движений, цианоз гребня и бородок у кур, у водоплавающих отмечали помутнение роговицы глаз, в отдельных случаях клинических признаков болезни не наблюдали. В течение нескольких суток падеж птиц начался и на соседних подворьях населенных пунктов. Всего было зарегистрировано 6 очагов инфекции в с. Долгово и 5 очагов в п. Ильинский [1, 11].

От птиц были отобраны пробы биоматериала, и в результате лабораторных исследований на базе КГБУ «Алтайская краевая ветеринарная лаборатория» и ФГБУ «Новосибирская межобластная ветеринарная лаборатория» был выявлен геном вируса гриппа A/H5. В соответствии с разработанным Планом противоэпизоотических мероприятий был проведен комплекс ветеринарно-санитарных мер по предупреждению и ликвидации гриппа птиц в населенных пунктах [1, 11].

Через территорию Алтайского края проходят Центрально-Азиатский и Восточно-Азиатский миграционные пути, и массовый перелет представителей гусеобразных и других отрядов птиц приходится на период с июля по октябрь, что позволяет высказать предположение о наличии источника инфекции в популяциях диких птиц. Предположительно, заражение домашних птиц могло произойти при контакте с мигрирующими птицами на озерах, расположенных в черте населенных пунктов, или же в результате потрошения охотничьих трофеев (дикие утки) на двух подворьях граждан, где зарегистрированы первые случаи инфекции. Ранее, в апреле 2008 г. схожая ситуация произошла в Приморском крае, когда внутренние органы добытых на охоте птиц были скормлены домашней птице, и на данном подворье произошел массовый падеж вследствие заражения высокопатогенным гриппом A/H5N1 [8].

Биоматериал от уток и гусей (4 пробы), отобранный на двух подворьях в с. Долгово, и 13 проб внутренних органов дикой и синантропной птицы были оперативно направлены в Референтную лабораторию вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) для выделения и изучения биологических свойств возбудителя болезни.

**Таблица 2**  
Результаты оценки клинического состояния птиц

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птиц	Период наблюдений, сут.				IVPI
		1	2	3	4-10	
A/duck/Altai/469/14 H5N1	Здоровые	5	0	0	0	2,67
	Больные	3	3	0	0	
	Тяжелобольные	2	1	3	0	
	Погибшие	0	6	7	10	
A/goose/Altai/472/14 H5N1	Здоровые	7	0	0	0	2,65
	Больные	3	2	0	0	
	Тяжелобольные	0	2	2	0	
	Погибшие	0	6	8	10	



Рис. 2. Цианоз лап и гребня через двое суток после инокуляции изолятов A/duck/Altai/469/14 H5N1 (справа) и A/goose/Altai/472/14 H5N1 (слева)

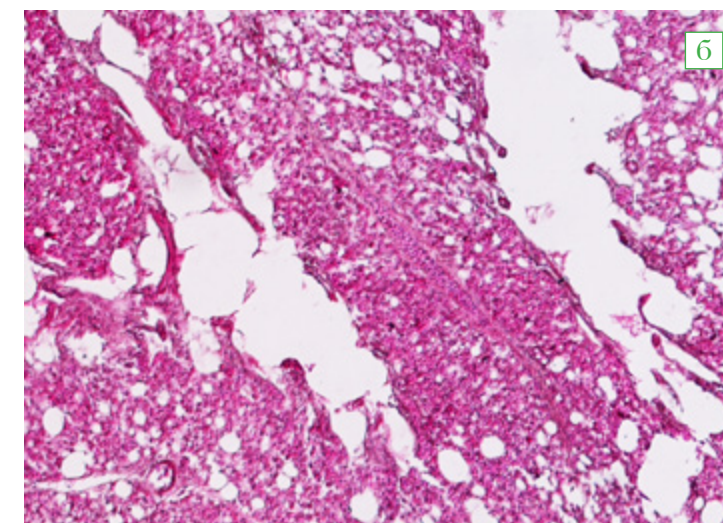
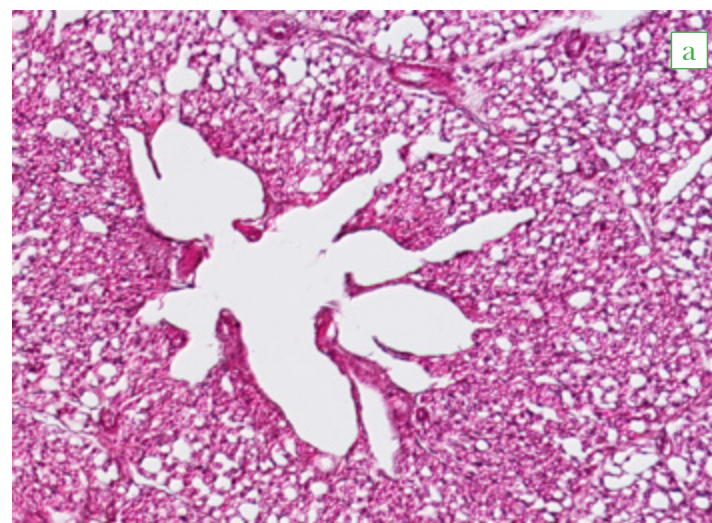
В результате исследований в ОТ-ПЦР в пробах был выявлен геном вируса гриппа птиц и идентифицирован подтип A/H5N1. Для определения потенциальной вирулентности вируса и его филогенетической принадлежности методом секвенирования определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена Н четырех выделенных изолятов (268 н.о.), которые оказались идентичны. При проведении сравнительного анализа было установлено, что исследуемые изоляты принадлежат к азиатской генетической линии вируса высокопатогенного гриппа птиц A/Gs/Gd/96, клада 2.3.2.1. Сайт расщепления гемагглютинаина содержит несколько основных аминокислот и имеет структуру -SPQRRRRKR-, что позволяет охарактеризовать вирус как потенциально высоковирулентный [7, 9].

С целью более полного описания биологических свойств этиологического агента вспышки болезни была

определена последовательность гена гемагглютинаина (34-1704 н.о.) изолята A/duck/Altai/469/2014 H5N1. С использованием международной базы данных GenBank было установлено (рис. 1), что наиболее родственными к изучаемому изоляту оказались вирусы гриппа клады 2.3.2.1 с обширной генетической линии вируса A/Gs/Gd/96, получившие распространение в Китае, Вьетнаме и других странах среди домашних (преимущественно утки) и диких птиц в 2011–2014 гг. (98–99% сходства) и в настоящее время вызывающие многочисленные вспышки болезни в Южной и Юго-Восточной Азии [11].

Гемагглютинин является одним из основных белков, определяющих ряд важнейших биологических свойств вируса гриппа, в первую очередь видовую специфичность (круг хозяев) и вирулентность. Так, ранее было установлено, что вирусы гриппа птиц имеют сходство к Sia2-3Gal-рецепторам эпителиальных клеток.

Рис. 3. Легкие цыпленка через трое суток после заражения изолятом A/duck/Altai/469/14 H5N1, окраска гематоксилин-эозин, окуляр 10, объектив 15: а — контроль; б — опытная группа



Вирус гриппа человека имеет аффинитет к Sia2-6Gal-рецепторам эпителиальных клеток органов дыхания. Соответственно, структуры рецепторосвязывающих сайтов имеют характерные отличия: было установлено, что наличие глутамина (Q) в позиции 226 и глицина (G) в позиции 228 (нумерация указана по последовательности подтипа H3) характерны для вирусов гриппа птиц, тогда как лейцин (L) и серин (S) в позициях 226 и 228 преимущественно выявляют у вирусов, инфицирующих человека [9, 10]. В табл. 1 приведены некоторые аминокислотные остатки белка гемагглютинаина, потенциально определяющие рецепторную специфичность вирусов гриппа человека и птиц (подтип H5), и вируса A/duck/Altai/469/2014 H5N1.

Как видно из приведенных данных, в указанных позициях гемагглютинаина вируса A/duck/Altai/469/2014 H5N1 находятся аминокислотные остатки, характерные для вирусов, инфицирующих преимущественно птиц. Однако биологические свойства вируса зависят не только от гемагглютинаина, и полученные результаты не исключают возможности инфицирования млекопитающих, в том числе и человека [9].

Для выделения вируса из проб патологического материала исследуемые суспензии инокулировали 10-суточным СПФ-КЭ. Эмбрионы, инокулированные суспензиями биоматериала домашних птиц, погибли в течение последующих 24–48 ч инкубации. На тушках эмбрионов наблюдали многочисленные кровоизлияния. С использованием РГА в ЭЭЖ был обнаружен гемагглютинирующий агент, идентифицированный в РТГА и РТНА как вирус гриппа А/Н5N1. Из проб биоматериала от диких и синантропных птиц вирус в течение трех последовательных пассажей выделен не был.

Для оценки инфекционной активности были использованы вирусы, выделенные из разных подворий с. Долгово Новичихинского района Алтайского края от утки (A/duck/Altai/469/14 H5N1) и гуся (A/goose/Altai/472/14 H5N1). Для изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 титр инфекционности имеет значение 8,75 Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл, для вируса A/goose/Altai/472/14 H5N1 — 8,5 Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл. Вирусы гриппа, вызвавшие

вспышки ВПП в предыдущие годы, имели близкие значения инфекционной активности: так, изолят A/goose/Krasnoozerskoye/627/2005 H5N1, выделенный от больного гуся в Новосибирской области в 2005 г., имел титр инфекционной активности в пределах 9,2 Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл, а изолят A/chicken/Krasnodar/123/2006 H5N1, выделенный от павшей курицы в Краснодарском крае в 2006 г., обладал инфекционной активностью 8,4 Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл [10]. Полученные данные позволяют заключить о выраженной инфекционной активности вирусов гриппа А/Н5N1, выделенных при вспышках болезни на территории Российской Федерации.

Для оценки вирулентных свойств изолятов A/duck/Altai/469/14 H5N1 и A/goose/Altai/472/14 H5N1 использовали метод определения ИВП при внутривенном заражении 6-недельных цыплят, рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения животных (МЭБ). Инкубационный период длился 1–2 сут., и в течение 2–3 сут. эксперимента погибли все зараженные птицы, что позволяет заключить об остром течении болезни. Результаты наблюдений за клиническим состоянием птиц и полученные значения ИВП представлены в табл. 2. Согласно наставлению МЭБ, вирусы гриппа птиц, имеющие индекс патогенности 1,2 и более (максимальное значение 3,0), идентифицируются как высоковирулентные [7].

При клиническом наблюдении отмечали отказ от корма и воды, депрессию, затрудненное дыхание, хрипы, одышку, синюшность (цианоз) гребня, боронок и лап (рис. 2), диарею (фекалии жидкие, зеленовато-желтого цвета). У отдельных особей наблюдали тремор, атаксию, нарушение координации движений.

При внешнем осмотре и патологоанатомическом вскрытии павшей птицы наблюдали конъюнктивиты, синуситы, застойные явления во внутренних органах, ярко выраженный геморрагический диатез, характеризующийся скоплением вязкого экссудата соломенного цвета в подкожной клетчатке головы и шеи, брюшной полости, что свидетельствовало о дисфункции органов кровообращения.

Оболочки головного мозга гиперемированы, селезенка увеличена, желчный пузырь переполнен, легкие отечны. При гистологическом исследовании было установлено, что в респираторной ткани лёгких зараженных птиц встречаются очаги дистелектазов (рис. 3). В трахее наблюдали адгезию реснитчатого слоя, катаральное воспаление и отек слизистого эпителия за счет инфильтрации лимфоцитами.

Печень, почки (рис. 4), брыжейка и серозная оболочка кишечника застойно гиперемированы (рис. 5). Слизистая оболочка кишечника утолщена, гиперемирована, местами пронизана точечными кровоизлияниями. Гистологические изменения тонкого кишечника кур проявлялись в виде деструкции ворсинок и гиперплазии стромы гладкомышечной слизистой оболочки.

Таким образом, полученные экспериментальные данные по оценке индексов патогенности изолятов A/duck/Altai/469/14 H5N1 и A/goose/Altai/472/14 H5N1 (значения 2,67 и 2,65) позволяют заключить о наличии выраженных вирулентных свойств у вирусов. Изоляты вызывали острое генерализованное заболевание с характерными для гриппа птиц клиническими признаками и патоморфологическими поражениями органов и тканей респираторной, пищеварительной, нервной и сердечно-сосудистой систем. Ранее проведенные эксперименты продемонстрировали способность изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 размножаться в различных органах и тканях цыплят и вызывать острую системную инфекцию при интраназальном заражении [2]. Высокая вирулентность для кур остается характерным признаком для вирусов гриппа А/Н5N1 азиатской генетической линии A/Gs/Gd/96, в том числе для изолятов, выделенных в разные годы на территории РФ [2, 4, 6, 10].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате лабораторных исследований проб патологического материала от домашней птицы, погибшей при вспышке острой инфекции в 2014 г. в Алтайском крае, были выделены и идентифицированы вирусы гриппа птиц А/Н5N1. Изоляты оказались способны к размножению в СПФ-КЭ без предварительной адаптации и обладали выраженной инфекционной активностью. Для изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 титр составил 8,75 Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл, для вируса A/goose/Altai/472/14 H5N1 — 8,5 Ig ЭИД<sub>50</sub>/мл. Инфекция у внутривенно зараженных цыплят протекает в тяжелой генерализованной форме, вызывая гибель всех птиц в течение двух-трех суток. Описаны характерные клинические признаки и патоморфологические изменения.

Установлена принадлежность вирусов к азиатской генетической линии высокопатогенного гриппа A/Gs/Gd/96, клада 2.3.2.1, получившей в настоящее время широкое распространение в странах Азии в стадах домашних и диких, в том числе мигрирующих, птиц. Структура сайта нарезания гемагглютинаина (-SPQRERRRRK-) и индексы патогенности изолятов (2,67 и 2,65) позволяют идентифицировать вирус как высоковирулентный. В результате определения нуклеотидной структуры гена гемагглютинаина и анализа полученных данных установлены молекулярно-генетические маркеры, потенциально определяющие рецепторную специфичность изучаемого вируса к клеткам птиц.

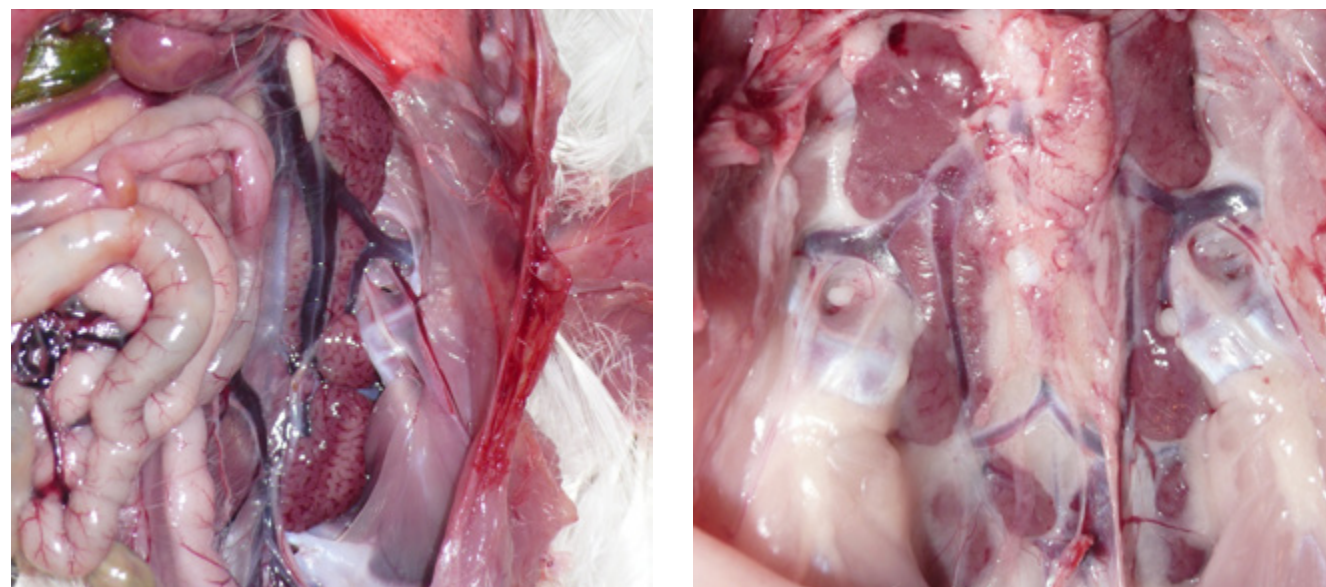


Рис. 5. Дуоденит и панкреатит у павшего цыпленка через двое суток после заражения A/duck/Altai/469/14 H5N1

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вспышка высокопатогенного гриппа птиц H5N1 на территории Алтайского края в 2014 г.: причины и опыт ликвидации / М.С. Волков, А.В. Варкентин, В.Н. Ирза, А.С. Старова // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3 (14). — С. 62–65.
2. Изучение особенностей патологического процесса у кур, вызванного изолятом вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1 / В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, М.А. Циванюк, И.А. Чвала // Ветеринария сегодня. — 2016. — № 1 (16). — С. 51–54.
3. Изучение первичной структуры генома изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1, выделенных на территории России в 2007 году / А.В. Андриясов, И.П. Пчелкина, И.А. Чвала, В.В. Дрыгин // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — 2014. — Т. 12. — С. 60–76.
4. Патоморфологические изменения у кур при экспериментальном заражении вирусом гриппа птиц А/Н5N1 / И.В. Бахчин, И.А. Чвала, М.А. Волкова [и др.] // Вестник ветеринарии. — 2014. — № 1 (68). — С. 47–51.
5. Сарыглар Л.К., Коломыцев А.А. Грипп птиц у диких уток в Республике Тыва // Вестник Тувинского государственного университета. — 2013. — № 2. — С. 180–184.
6. Чвала И.А. Особенности гриппа птиц А/Н5N1 у кур // Ветеринария. — 2012. — № 12. — С. 27–28.
7. Avian influenza (infection with avian influenza viruses) // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. — 2016. — Vol. 2, Chap. 2.3.4. — URL: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf).
8. H5N1 avian influenza outbreak in the Far East of Russia in 2008: New introduction / T.B. Manin, I.A. Chvala, S.N. Kolosov [et al.] // Avian Dis. — 2010. — Vol. 54, № 1 (Suppl.). — P. 509–512.
9. Imai M., Kawaoka Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses // Virology. — 2012. — Vol. 2. — P. 160–167.
10. Influenza (H5N1) viruses in poultry, Russian Federation, 2005–2006 / A.S. Lipatov, V.A. Evseenko, H. Yen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 13, № 4. — P. 539–546.
11. World Animal Health Information Database (WAHID). — URL: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home).

Рис. 4. Нефрит и кровенаполненность брюшной полости у цыпленка (слева), павшего через трое суток после заражения A/goose/Altai/472/14 H5N1; почка цыпленка контрольной группы, убитого с диагностической целью через трое суток эксперимента (справа)







УДК 619:616.98:578,835.2(519)

## ВСПЫШКИ ЯЩУРА НА ТЕРРИТОРИИ ЮЖНОЙ КОРЕИ И ЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

А.А. Фунтиков<sup>1</sup>, С.Р. Кременчугская<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», e-mail: kremenchugskaya@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

В статье рассматриваются данные Всемирной организации здравоохранения животных о вспышках ящура с оценкой экономического ущерба в Республике Корея в 2000, 2002, 2010 гг. с акцентом на анализ современной эпизоотической ситуации по ящуру 2014–2016 гг. на Корейском полуострове. Показана важность проблемы профилактики, ликвидации, контроля и мер борьбы с ящуром на территории стран Корейского полуострова и Тихоокеанского региона в целом.

Ключевые слова: ящур, экономический ущерб, Южная Корея, Северная Корея, меры борьбы, профилактика и ликвидация ящура.

UDC 619:616.98:578,835.2(519)

## FMD OUTBREAK IN SOUTH KOREA AND ITS ECONOMIC CONSEQUENCES

A.A. Funtikov<sup>1</sup>, S.R. Kremenchugskaya<sup>2</sup>

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

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

### SUMMARY

The paper presents OIE data on FMD outbreaks and assesses economic losses in the Republic of Korea in 2000, 2002, 2010 with a special attention given to the analysis of the FMD current epidemic situation on the Korean Peninsula in 2014–2016. The paper demonstrates the importance of FMD prevention, eradication, control in the countries of the Korean Peninsula and the Pacific Region.

Key words: FMD, economic losses, South Korea, North Korea, control measures, FMD prevention and eradication.

В 2015 г. в мире было зарегистрировано 72 неблагополучные по ящуру страны, официально сообщившие о вспышках в МЭБ. И хотя наибольшее количество неблагополучных стран находятся на территории Африканского континента, Азиатский континент занимает второе место по количеству неблагополучных стран. Представленные МЭБ данные по-прежнему свидетельствуют об эпизоотическом неблагополучии и стационарности ящура на территории стран Азии и Ближнего Востока [10]. Российский и зарубежный опыт свидетельствуют о том, что вирус ящура может быть занесен на территорию благополучных стран с контаминированной продукцией животноводства, животными, автотранспортом, туристами, мигрантами, паломниками и обслуживающим персоналом ферм. Исходя из

этого, можно сделать вывод, что риск распространения ящура из соседних стран на территорию России по-прежнему высок. В связи с этим представляется важным уделить особое внимание изучению эпизоотической ситуации по этой болезни в сопредельных государствах.

Ветеринарная служба Южной Кореи применяет различные меры борьбы с ящуром, финансирует профилактические мероприятия, проводит мониторинговые исследования и ведет научно-исследовательскую работу по проблемам ящура, тесно сотрудничая со многими центрами по всему миру. Страна являлась благополучной по ящуру с 1934 г., но в 2000 г. в регионе был установлен ящур типа О генетической линии PanAsia. На территории страны с подозрением на ящур была

выявлена 81 голова КРС, и в результате проведенных противоэпизоотических мероприятий были уничтожены 2216 животных и вакцинированы 661 770. Вспышка была быстро ликвидирована благодаря оперативным предпринятым действиям ветеринарной службы.

Следующую вспышку в стране зафиксировали в 2002 г., впоследствии она стала второй по величине и экономическим затратам на ликвидацию. Вирус ящура относился к тому же типу и генетической линии, что и в 2000 г. За первые месяцы была выявлена только с клиническими признаками 661 голова свиней, пало порядка 310 голов, в то время как среди КРС было выявлено только одно большое животное. Сразу после обнаружения вспышки руководство страны предприняло жесткие меры по ликвидации, в результате чего были уничтожены 158 708 голов КРС и 1372 свиньи. Несмотря на значительный экономический ущерб, применение метода «стемпинг аут» оказалось оправданным и способствовало скорейшему искоренению болезни в регионе. В течение последующих восьми лет Южная Корея оставалась страной, свободной от ящура без вакцинации [5].

Самая крупная эпизоотия ящура в Южной Корее наблюдалась в период с 2010 по 2012 гг. Сразу два типа вируса были зарегистрированы на территории страны. Вирус ящура типа А, топотипа Азия, генетической линии SEA-97 был зарегистрирован в провинции Кенгидо в начале января 2010 г. среди КРС и оленей. Нуклеотидное секвенирование, которое было проведено Национальной службой ветеринарных исследований и карантин Республики Корея, выявило близкое генетическое родство изолята со штаммами A/TAI/14/2008 и A/MAY/2/2008. Также вирус был близкородственен изолятам из Китая (2009), Лаоса (2008), Таиланда (2009) и Вьетнама (2008–2009). Данная вспышка была быстро ликвидирована [6].

Сообщение о возникновении вспышек ящура типа О было впервые опубликовано 12 апреля 2010 г., данный тип ящура относился к топотипу SEA генетической линии Муа-98. Вспышка распространилась сразу по нескольким провинциям, впервые ее зарегистрировали в провинции Гангва. Нуклеотидное секвенирование подтвердило родство корейских изолятов со штаммами O/MYA/6/2009 и O/HKN/15/2010. За период апрель – июнь 2010 г. были выявлены 7 вспышек типа О (SEA Муа-98). После применения стемпинг аута и дезинфекции вакцинация и серологические исследования были прекращены, но в ноябре 2010 г. Корея сообщила о новых вспышках ящура типа О, вызванных вирусом, генетически родственным предыдущим изолятам 2010 г. [8].

Изолят, который был выявлен 21 ноября 2010 г. в провинции Ангдон, имел генетическое родство с российским O/RUS/Jul 2010 (ARRIAH) и японским O/JPN/2010 (NIAH) изолятами. 16 декабря 2010 г. был выявлен новый изолят в провинциях Янгджу и Янчон, также генетически родственный O/JPN/2010 (NIAH). Из этого можно сделать вывод, что эпидемия продвигалась вглубь страны. Следующая вспышка была обнаружена в городе Пайю. Всего по состоянию на 2010 г. в Южной Корее зафиксировали 36 вспышек ящура типа О и одну вспышку типа А в четырех провинциях.

Сразу после выявления первых вспышек ветеринарная служба Южной Кореи начала проводить меры по ликвидации болезни и недопущению ее распро-



Рис. 1. Вспышки, отмеченные на территории Республики Корея за период с 2010 по 2012 гг.

(<http://www.fao.org/ag/againfo/comissions/eufmd/comissions/eufmd-home/reports/general-sessions/en/>)

странения в другие районы страны. К концу 2010 г. с применением политики стемпинг аут было уничтожено свыше 50 тысяч животных, из них около 11 тысяч голов КРС и более 38 тысяч свиней.

Согласно данным картографии, первые вспышки ящура были замечены на границе с Северной Кореей и затем начали продвигаться вглубь страны. На тот момент ветеринарная служба страны обозначила пять угрожаемых зон, разделив их по степени риска. Но если в ноябре 2010 г. ситуация по болезни имела статус «угрожаемой», то уже 29 декабря 2010 г. ветеринарные эксперты вынуждены были признать, что ситуация приобрела статус «критической». Несмотря на все предпринятые со стороны корейских властей меры по ликвидации, эпизоотия продвигалась вглубь региона. В большей степени этому способствовали климатические условия. В 2010 г. в Южной Корее отмечалось рекордное похолодание и огромное для данного региона количество осадков. В результате чего такая мера ликвидации, как дезинфекция, просто исчерпала себя ввиду того, что дезинфектанты, используемые южнокорейскими ветеринарами в условиях минусовых температур, теряли свои свойства, и вся процедура оказывалась неэффективной [7]. Общие экономические затраты на ликвидацию и ограничение эпизоотии только в 2010 г. составили порядка 157 млн долл. США, но уже 21 марта 2011 г. в стране была выявлена новая вспышка. Всемирная референтная лаборатория ФАО/МЭБ по ящуру (Пербрайт, Великобритания) подтвердила наличие ящура типа О, топотипа SEA линии Муа-98 в провинции Гангвон [2].

В общей сложности эпизоотия ящура типа О 2010–2012 гг. поразила более 3700 ферм практически на всей территории республики (рис. 1), для ликвидации вспышки ветеринарные службы страны уничтожили

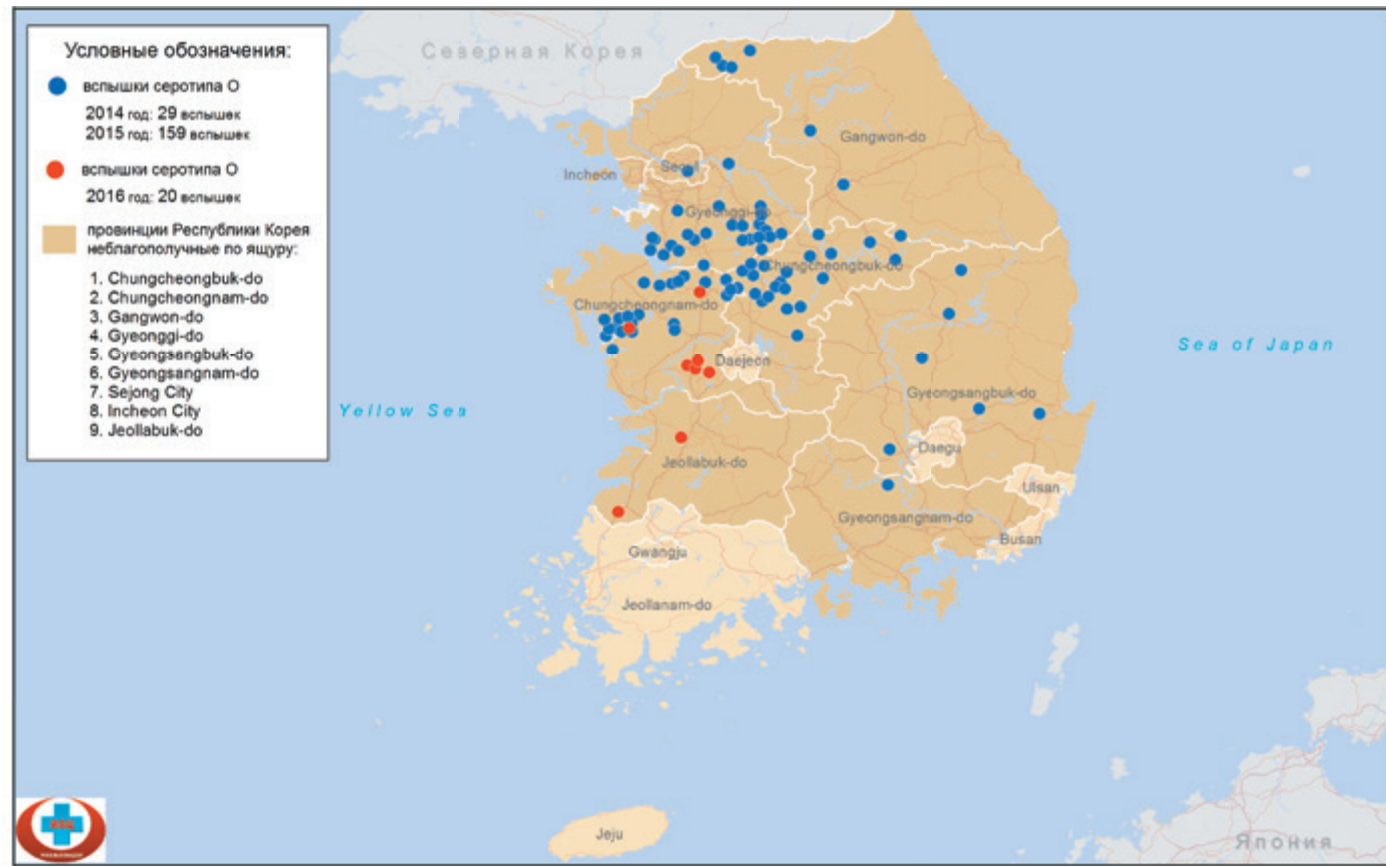


Рис 2. Эпизоотическая ситуация по ящуру на территории Республики Корея за период с 2014 по 2016 гг. (<http://www.arriah.ru/>)

рекордные 3,48 млн голов животных, а экономический ущерб составил более 2,7 млрд долл. США. Вспышка, которая бушевала в регионе с ноября 2010 по апрель 2012 гг., нанесла огромный ущерб животноводству страны, в результате чего производство собственной продукции в регионе сократилось на 30%, а импорт продукции из других стран вырос на 90% [1].

В связи с широкомасштабным распространением болезни в республике ветеринарная служба была вынуждена, хоть и с опозданием, начать проведение вынужденной вакцинации поголовья. Для иммунизации была использована вакцина фирмы Meril (Франция), в общей сложности было вакцинировано около 2,6 млн голов КРС и 1,3 млн свиней. Учитывая тот факт, что первые вспышки наблюдались на границе республики, данный метод профилактики болезни должен был проводиться повсеместно, особенно на границе с КНДР. Штаммы, выделенные на территории Южной Кореи, имели генетическое родство с изолятами, которые были распространены в соседних странах Юго-Восточной Азии (Малайзия, Таиланд, Китай), а данный регион является эндемичным по ящуру. Как следствие несвоевременного применения противоящурной вакцинации животных, в результате наращивания торгово-экономических связей риск заноса болезни в Южную Корею значительно возрос, что привело к возникновению крупной эпизоотии [1].

Начиная с 2012 по 2014 г. вспышек ящура на территории страны не наблюдалось, и правительство республики вновь возобновило работу по получению статуса региона как страны, свободной от ящура без вакцинации. Но уже в июле 2014 г. ветеринарная служ-

ба была вынуждена признать, что в стране появилась новая эпизоотия. 8 августа 2014 г. Всемирная референтная лаборатория подтвердила наличие в регионе вируса ящура типа О, данный штамм был обнаружен в провинции Бьян-Мьен и относился к топотипу SEA линии Муа-98. Первые три вспышки наблюдались среди свиней. По данным Пербрайтской лаборатории, это был новый занос вируса О/SEA/Муа-98 в республику, отличающегося от вируса предыдущих вспышек в 2010–2011 гг. [10].

Результаты матчинга продемонстрировали наличие антигенного родства корейских изолятов с производственными штаммами вируса ящура О/3039, О/Tur/5/094 и О/Тайвань/98, но не со штаммом О/Маниса [3]. Также было установлено антигенное различие штамма О/SKR/2014/14 и со штаммами О/Индия P3/75 с использованием двух серий сыворотки вакцинированного КРС [4]. Тем не менее, за период с января по март 2015 г. было зарегистрировано более 100 вспышек болезни среди поголовья свиней на фоне вакцинации препаратами, в состав которых входил штамм О/Маниса [11].

Следует уточнить, что ящур того же типа еще в феврале 2014 г. был отмечен в соседней Северной Корее, где клинические признаки ящура наблюдались у 1834 животных, из которых 277 голов пало, тогда как в Южной Корее, по состоянию на август 2014 г., пало всего 3 животных. Как в Северной Корее, так и в Южной эпизоотия распространялась преимущественно среди свиней, в то время как случаи болезни у КРС практически отсутствовали. И хотя КНДР отчиталась только о 33 случаях болезни, из примечания Отдела

санитарной информации МЭБ можно было сделать вывод, что вспышка распространялась по региону более значительными темпами. Ввиду того, что ветеринарные службы Республики Корея не обратили должного внимания на распространение ящура в соседней стране, ящур быстро перешел границу двух республик, и с 3 декабря 2014 г. по 28 апреля 2015 г. среди свиней и КРС было зарегистрировано 185 вспышек. Было уничтожено свыше 160 356 животных.

Начиная с мая 2015 г., вспышек в регионе не наблюдалось, однако 2 новые вспышки были зарегистрированы на свиноферме в провинции Чолла-Пукто на юго-западе Южной Кореи. Вспышка данного типа на территории республики не ликвидирована до сих пор, и только в начале 2016 г. ветеринарной службе Южной Кореи пришлось уничтожить порядка 11 тысяч свиней. Первое сообщение в 2016 г. поступило 18 января, с применением метода стемпинг аут ветеринарная служба страны уничтожила 10 172 свиньи. Второе сообщение было опубликовано 21 февраля, на конец месяца в республике были отмечены две вспышки в провинции Чхунчон-Намдо, ветеринарной службой были уничтожены 3144 свиньи. Несмотря на принятые меры, 20 марта 2016 г. в той же провинции ветеринарная служба Южной Кореи зафиксировала 10 очагов, в которых были уничтожены 10 575 животных (свиньи). Последнее сообщение было опубликовано 27 марта, на тот момент было зафиксировано 6 действующих очагов, на территории которых было уничтожено 4654 гол. свиней [9]. Данные картографии за период с 2014 по 2016 гг., предоставленные сотрудниками ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», показаны на рис. 2.

Сложившаяся эпизоотическая ситуация по ящуру на территории Республики Корея указывает на то, что ящур типа О по-прежнему распространен в регионе. Учитывая тот факт, что данный штамм поражает не только свиней, но и крупный рогатый скот, увеличивается риск инфицирования смешанной популяции животных не только в Корее, но и за пределами страны и по всему Тихоокеанскому региону в целом. Этому также сопутствуют все более интенсивные торговые отношения между странами Восточной Азии, особенно между Китаем, Монголией, Таиландом и Российской Федерацией. Все это способствует увеличению вероятности риска заноса ящура и на территорию РФ.

Ящур является одним из наиболее экономически значимых заболеваний в мире, при котором ущерб в первую очередь складывается за счет снижения производства продукции животноводства и потери международных рынков. При возникновении вспышек болезни в регионах с интенсивным производством и высокой плотностью животных в мелких хозяйствах (Южная Корея, Китай, Таиланд), по нашему мнению, политика «стемпинг аут» без применения вакцинации с использованием актуальных для региона вакцинных штаммов не дает должных результатов в борьбе с распространением ящура. Примером этому может служить использование данного метода в Республике Корея, где даже при тотальном уничтожении поголовья через небольшие промежутки времени вновь возникают вспышки болезни.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из вышесказанного можно сделать вывод, что в связи с все более нарастающей неблагополучной ситуацией по ящуру в Тихоокеанском регионе и в мире в целом ветеринарным службам стран, находящихся в

этой зоне, необходимо уделить особое внимание профилактическим мероприятиям. Как показала практика, такой метод борьбы, как стемпинг аут, не всегда приводит к предотвращению возникновения новых вспышек, зачастую необходимо сочетать этот метод борьбы с профилактической вакцинацией. Поэтому нужно создавать и контролировать буферные зоны в странах, граничащих с эндемичными регионами, а также усилить контроль по перемещению продукции сельскохозяйственного производства с этих территорий. Также необходимо проводить тщательный мониторинг эпизоотической ситуации в регионе с целью недопущения распространения болезни вглубь континента, в том числе вероятного заноса болезни в РФ, но для этого требуется наладить более тесное ветеринарное сотрудничество между странами Восточной Азии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуленкин В.М. Ящур в азиатско-тихоокеанском регионе и его экономические последствия // Ветеринария. — 2014. — № 9. — С. 4–8.
2. Control of foot and mouth disease during 2010–2011 epidemic, South Korea / J.-H. Park, K.-N. Lee, Y.-J. Ko [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2013. — Vol. 19, № 4. — P. 655–659.
3. Foot-and-Mouth Disease Situation. Monthly Report, September 2014 / Food and Agriculture Organization of the United Nations. — URL: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/eufmd/docs/FMD\\_monthly\\_reports/Final\\_September2014.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/docs/FMD_monthly_reports/Final_September2014.pdf) (дата обращения: 11.04.16).
4. Foot-and-Mouth Disease Situation. Monthly Report, July 2015 / Food and Agriculture Organization of the United Nations. — URL: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/eufmd/docs/FMD\\_monthly\\_reports/2015/July\\_2015rev.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/docs/FMD_monthly_reports/2015/July_2015rev.pdf) (дата обращения: 11.04.16).
5. Investigation of disinfectants for foot-and-mouth disease in the Republic of Korea / H.-M. Kim, I.-S. Shim, Y.-W. Baek [et al.] // J. Infect Public Health. — 2013. — Vol. 6, № 5. — P. 331–338.
6. S. Korea culls 15 pct of pigs, cattle for foot-and-mouth / Thomson Reuters Foundation News. — URL: [http://www.trust.org/item/?map=update\\_2\\_skorea\\_culls\\_15\\_pct\\_of\\_pigs\\_cattle\\_for\\_foot\\_and\\_mouth](http://www.trust.org/item/?map=update_2_skorea_culls_15_pct_of_pigs_cattle_for_foot_and_mouth) (дата обращения: 10.04.16).
7. S. Korea set to adopt livestock permit system / Yonhap News Agency. — URL: <http://english.yonhapnews.co.kr/business/2011/05/06/29/0501000000AEN20110506003300320F.HTML> (дата обращения: 10.04.16).
8. Southeast Asian foot-and-mouth disease viruses in Eastern Asia / N.J. Knowles, J.J. He, Y. Shang [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 18, № 3. — P. 499–501.
9. World Animal Health Information Database (WAHID). — URL: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home) (дата обращения: 10.04.2016).
10. World Organization for Animal Health (OIE). — URL: <http://web.oie.int/hs2/report.asp> (дата обращения: 10.04.16).
11. WRLFMD Quarterly Report. Foot-and-Mouth Disease: January to March 2015. — URL: [http://www.wrlfmd.org/ref\\_labs/ref\\_lab\\_reports/OIE-FAO%20FMD%20Ref%20Lab%20Report%20Jan-Mar%202015.pdf](http://www.wrlfmd.org/ref_labs/ref_lab_reports/OIE-FAO%20FMD%20Ref%20Lab%20Report%20Jan-Mar%202015.pdf) (дата обращения: 11.04.16).

# РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ К *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* В СЫВОРОТКАХ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Е.С. Кострова<sup>1</sup>, О.П. Бьядовская<sup>2</sup>, Е.В. Пешкова<sup>3</sup>, О.В. Прунтова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kostrova@arriah.ru

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

<sup>3</sup> магистрант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

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

## РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе непрямого варианта ИФА для определения антител к *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови крупного рогатого скота разных половозрастных групп. В качестве антигена использовали липополисахаридный антиген, полученный фенольно-водной экстракцией из штамма *Mannheimia haemolytica* № 29696 из коллекции микроорганизмов АТСС. Представлены результаты сравнительного исследования сывороток крови крупного рогатого скота с помощью предложенной тест-системы и коммерческой тест-системы «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия). Определена относительная специфичность и чувствительность разработанного метода.

Ключевые слова: *Mannheimia haemolytica*, иммуноферментный анализ, липополисахаридный антиген, крупный рогатый скот.

# DESIGN OF INDIRECT ELISA-BASED TEST-SYSTEM FOR DETERMINATION OF *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ANTIBODY TITRE IN BOVINE SERA

Ye.S. Kostrova<sup>1</sup>, O.P. Bjadovskaya<sup>2</sup>, Ye.V. Peshkova<sup>3</sup>, O.V. Pruntova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kostrova@arriah.ru

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

<sup>3</sup> Master's Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir

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

## SUMMARY

Indirect ELISA-based test-system was developed for determination of *Mannheimia haemolytica* antibody titre in sera from cattle of different age-sex groups. Lipopolysaccharide antigen (LPS-antigen) produced by phenol-water extraction from *Mannheimia haemolytica* strain No. 29696 (ATCC collection) was used as an antigen. Results obtained during the comparative examination of bovine sera using the proposed test-system and commercial test-system «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Belgium) are demonstrated. Relative specificity and sensitivity of the designed method were determined.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, enzyme-linked immunosorbent assay, lipopolysaccharide antigen, cattle.

## ВВЕДЕНИЕ

Возбудители рода *Mannheimia* вызывают болезни сельскохозяйственных животных с различными клиническими проявлениями, поражающие респираторный, желудочно-кишечный и репродуктивный тракт, нередко заканчивающиеся летально. В результате ослабления организма, потерь прироста живой массы, потомства, потерь от падежа и вынужденного убоя больных

животных, а также затрат на проведение лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятий наносится большой экономический ущерб животноводческой отрасли сельского хозяйства при инфекциях, вызываемых бактериями рода *Mannheimia* [1].

Род *Mannheimia* относится к семейству *Pasteurellaceae*, которое также включает роды *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus* и др. — возбу-

Таблица 1

Влияние состава блокирующих растворов на оптическую плотность (ОП) контрольных сывороток в непрямом варианте ИФА (n=3)

ОП контрольных сывороток в разведении 1:10	Блокирующий раствор					
	Обезжиренное сухое молоко, в концентрации			Сыворотка крови лошади, в концентрации		
	10%	3%	1%	10%	3%	1%
+ сыворотка	0,682±0,08	1,110±0,13	0,299±0,15	0,139±0,09	0,286±0,06	0,247±0,06
- сыворотка	0,154±0,08	0,096±0,13	0,068±0,05	0,05±0,03	0,05±0,03	0,05±0,03
P/N	4,43	11,56	4,39	2,78	5,72	4,94

телей болезней многих видов млекопитающих, птиц и человека всех возрастных групп.

К заболеваниям, вызываемым *Mannheimia haemolytica*, относятся респираторные инфекции крупного и мелкого рогатого скота, в том числе синдром «транспортной лихорадки» (легочный пастереллез), а также мастит коров и овец. *Mannheimia haemolytica* является комменсалом верхнего респираторного тракта животных, способствует энзоотиям пневмоний телят и при этом заболевании выступает как вторичная инфекция на фоне вирусных инфекций крупного рогатого скота [3, 5].

К манхеймиозам наиболее восприимчивы молодые крупного и мелкого рогатого скота. У телят признаки инфекции наблюдаются в первые дни жизни. *Mannheimia haemolytica* выявляют преимущественно в легких больных животных. По данным литературы известно, что этот условно-патогенный микроорганизм быстро размножается и за счет активации факторов патогенности вызывает острую фибринозную бронхопневмонию, приводящую к летальному исходу на фоне транзитной вирусной инфекции [1, 4].

Основным звеном в системе мер профилактики и борьбы с данным заболеванием является вакцинация. Изучение иммунобиологических свойств, антигенной активности и проведение технологического контроля на различных этапах производства вакцин предполагает определение уровня специфических антител в сыворотках крови крупного рогатого скота и лабораторных животных.

Целью данной работы явилась разработка тест-системы для определения титра антител к липополисахаридному антигену *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови крупного рогатого скота посредством непрямого варианта иммуноферментного анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Антиген.** В работе использовали культуру штамма *Mannheimia haemolytica* № 29696 из коллекции штаммов АТСС, выращенную на плотной питательной среде: 1,5% агар на основе перевара по Хоттингеру с добавлением 10% эритроцитов крови лошади (ХКЭ). Культивирование бактерий для получения биомассы проводили в аэробных условиях при 37 °С в течение 24 ч.

Липополисахаридный антиген (ЛПС-АГ) получали методом фенольно-водной экстракции по методике R.P. Darveau и R.E.W. Hancock с модификациями [2]. Раз-

ведения антигена готовили на 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,5–9,6.

**Сыворотка крови.** В качестве контроля использовали положительную и отрицательную контрольные сыворотки крови КРС коммерческой тест-системы «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия), специфичную к ЛПС-АГ *Mannheimia haemolytica*. Также в работе использовали сыворотки крови от разных половозрастных групп КРС из хозяйств различных регионов РФ.

**Конъюгат.** Применяли антивидовые иммуноглобулины против IgG КРС, конъюгированные с пероксидазой хрена (ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва).

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** проводили с использованием коммерческой тест-системы «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия) согласно инструкции производителя и тест-системы Н-ИФА-«ВНИИЗЖ».

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема непрямого варианта ИФА. Сенсбилизацию планшетов проводили путем внесения в каждую лунку по 50 мкл антигена в рабочем разведении в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,6. Планшет инкубировали 18–20 ч при температуре 4 °С. После удаления несвязавшихся компонентов, не отмывая, в лунки планшета вносили по 50 мкл 1 М трис-НСI с 0,15 М NaCl блокирующего буферного раствора (TBS), содержащего 3% обезжиренного сухого молока (Marvel), и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем планшеты трижды отмывали промыточным буферным раствором TBS, содержащим 0,05% Твин-20 (TBS-T). Пробы сывороток вносили в объеме 50 мкл в первые лунки планшета в разведении 1:10 и титровали методом последовательных двукратных разведений. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С. Повторяли отмывку планшетов от несвязавшихся компонентов реакции, затем вносили антивидовой конъюгат в рабочем разведении 1:6000 и инкубировали в тех же условиях. После отмывки проводили индикацию реакции внесением субстрата АБТС. Через 15–20 мин после окрашивания реакцию останавливали путем внесения 50 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия (ДСН). Измерение абсорбции исследуемых проб проводили на спектрофотометре «Sunrise» (TECAN, Австрия) при длине волны 405 нм. Все испытуемые пробы исследовали в трех повторностях.

Результаты анализа выражали в виде титра сыворотки. Титром сыворотки считали ее последнее разведение, при котором величина оптической плотности

Таблица 2  
Результаты исследования сывороток крови КРС в ИФА

Возрастная группа животных	«Mannheimia haemolytica ELISA KIT» (BIOX, Бельгия)		ИФА-«ВНИИЗЖ»	
	% позитивности <sup>1</sup>	результат	титр <sup>2</sup>	результат
Телята, до выпойки молозива	13	отр.	1:10	отр.
	5,8	отр.	1:10	отр.
	0	отр.	1:10	отр.
	11	отр.	1:10	отр.
	5	отр.	1:10	отр.
Телята до месяца, после выпойки молозива	39	пол.	1:20	сомн.
	14	отр.	1:10–1:20	отр.
	69	пол.	1:160	пол.
	266	пол.	1:80	пол.
	206	пол.	1:40–1:80	пол.
Телята 1–3 месяца	133	пол.	1:40	пол.
	38	пол.	1:20	сомн.
	18	отр.	1:10	отр.
	24	пол.	1:40–1:80	пол.
	9	отр.	1:10	отр.
Телята 6–12 месяцев	26	пол.	1:80	пол.
	62	пол.	1:40–1:80	пол.
	32	пол.	1:20	сомн.
	154	пол.	1:40–1:80	пол.
	31	пол.	1:10	отр.
Нетели 1–2 года	15	отр.	1:10	отр.
	24	пол.	1:40	пол.
	14	отр.	1:10	отр.
	18	отр.	1:20	сомн.
Коровы старше 2 лет	206	пол.	1:80	пол.
	86	пол.	1:80	пол.
	36	пол.	1:160	пол.
	72	пол.	1:40–1:80	пол.
	44	пол.	1:160	пол.
Коровы старше 2 лет	239	пол.	1:160	пол.
	88	пол.	1:80	пол.
	150	пол.	1:160	пол.
	237	пол.	1:80–1:160	пол.
	183	пол.	1:80–1:160	пол.
Коровы старше 2 лет	203	пол.	1:160	пол.

<sup>1</sup> в коммерческом наборе «Mannheimia haemolytica ELISA KIT» (BIOX, Бельгия): <23% — результат отрицательный, ≥23% — результат положительный;

<sup>2</sup> титр в ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ»: 1:20–1:40 — сомнительный результат, ≥1:40 — положительный результат.

Таблица 3  
Оценка относительной чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы ИФА-«ВНИИЗЖ»

Результаты BIOX	ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ»		
	положит.	отр.	всего
Положительных проб	118/a	9/c	127/(a+c)
Отрицательных проб	9/d	47/b	56/(d+b)
Всего проб	127	56	n=183

a — истинно положительные результаты; b — истинно отрицательные результаты; c — ложноотрицательные результаты; d — ложноположительные результаты.

вдвое превосходила оптическую плотность в лунках с отрицательной контрольной сывороткой. Положительными считали пробы сывороток крови с титром 1:40 и выше.

Для обработки данных использовали компьютерную программу «Statistica 10».

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка тест-системы для ИФА предполагает подбор оптимального содержания различных компонентов реакции, в том числе буферных растворов. После адсорбции антигена актуальным является блокирование остаточных свободных центров связывания лунок планшетов с целью уменьшения неспецифического взаимодействия с конъюгатом. Было проведено испытание ряда иммунологически индифферентных белков, применение которых позволило бы снизить уровень неспецифического взаимодействия. С этой целью использовали растворы обезжиренного сухого молока и сыворотки крови лошади в концентрациях 10, 3 и 1%. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Полученные результаты показали, что значение P/N (отношение средних оптических плотностей положительной и отрицательной контрольных сывороток) было наибольшим (11,56) при использовании 3% раствора обезжиренного сухого молока, что позволило выбрать данный блокирующий буферный раствор как наиболее оптимальный. С помощью разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА и коммерческой тест-системы провели исследование 270 полевых сывороток крови от КРС из хозяйств различных регионов Российской Федерации. Были проанализированы уровни содержания антител к *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови КРС различных возрастных групп. Результаты исследования сывороток крови частично представлены в табл. 2.

На основании данных, представленных в табл. 2, можно отметить, что антитела были выявлены у всех возрастных групп КРС, а наибольший уровень антител (1:80–1:160), определенный с помощью разработанной тест-системы, наблюдается у животных старше 12 месяцев.

С целью оценки относительной специфичности и чувствительности проводили сравнение результатов, полученных с применением разработанной тест-системы и при использовании коммерческого набора «Mannheimia haemolytica ELISA KIT» (BIOX, Бельгия). Результаты исследования 183 сывороток крови КРС с помощью двух тест-систем представлены в табл. 3.

Относительную чувствительность (Se) рассчитывали по формуле:  $a/(a+c) \times 100\%$ .

Относительную специфичность (Sp) определяли по формуле:  $d/(b+d) \times 100\%$ .

Таким образом, относительная чувствительность разработанной тест-системы составила 93%, а относительная специфичность — 84%.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была разработана тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа для определения титра антител к липополисахаридному антигену *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови КРС. Показано, что разработанная тест-система имеет выраженную относительную чувствительность 93% и специфичность 84%.

Разработанная методика успешно прошла комиссионные испытания и применяется при проведении серологического мониторинга для определения уровня постинфекционных и поствакцинальных антител к *Mannheimia haemolytica* КРС.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин [и др.]; ред. А.А. Сидорчук. — М.: КолосС, 2007. — 671 с.
2. Современное состояние проблемы респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, О.И. Гетманский, В.В. Думова [и др.] // Диагностика, профилактика и лечение болезней животных: сб. науч. тр. — Новосибирск, 2008. — С. 41–44.
3. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах / А.Г. Готов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова [и др.] // Ветеринария. — 2014. — № 4. — С. 7–11.
4. Darveau R.P., Hancock R.E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains // J. Bacteriol. — 1983. — Vol. 155, № 2. — P. 831–838.
5. Singh K.J., Ritchey W., Confer A.W. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial-host interaction in bovine pneumonia // Vet. Pathol. — 2010. — Vol. 48, № 2. — P. 338–348.
6. Yates W.D. Interaction between viruses and bacteria in bovine respiratory disease // Can. Vet. J. — 1984. — Vol. 25. — P. 37–41.

# ПРОБЛЕМА ПРОФИЛАКТИКИ И ЛИКВИДАЦИИ ОЧАГОВ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Р.А. Кривонос<sup>1</sup>, Г.А. Джаилиди<sup>2</sup>, А.В. Мищенко<sup>3</sup>, В.А. Мищенко<sup>4</sup>, О.Ю. Черных<sup>5</sup>, В.Н. Шевкопляс<sup>6</sup>, С.Г. Дресвянникова<sup>7</sup>, Д.В. Коломиец<sup>8</sup>, С.В. Тихонов<sup>9</sup>

<sup>1</sup>заместитель руководителя, аспирант, Госветуправление Краснодарского края, г. Краснодар, e-mail: sinkubani@mail.ru

<sup>2</sup>руководитель, кандидат биологических наук, Госветуправление Краснодарского края, г. Краснодар, e-mail: uv@krasnodar.ru

<sup>3</sup>заместитель директора, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mischenko@arriah.ru

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

<sup>5</sup>директор, доктор ветеринарных наук, ГБУ КК «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория», г. Кропоткин, e-mail: gukkv150@kubanvet.ru

<sup>6</sup>директор, доктор ветеринарных наук, Департамент ветеринарии МСХ РФ, г. Москва, e-mail: shevkoptyasvn@gmail.com

<sup>7</sup>начальник, кандидат ветеринарных наук, ГКУ КК КСББЖ, г. Краснодар, e-mail: kraivet.dsg@mail.ru

<sup>8</sup>начальник отдела, Госветуправление Краснодарского края, г. Краснодар

<sup>9</sup>главный ветеринарный врач, кандидат биологических наук, ГКУ КК КСББЖ, г. Краснодар, e-mail: tikhonov14@mail.ru

## РЕЗЮМЕ

В статье приведены данные о распространении нодулярного дерматита крупного рогатого скота в Российской Федерации, странах Ближнего Востока, Азербайджане, Армении, Грузии, Греции, Болгарии, Македонии, Сербии, Албании и Косово. Представлена характеристика эпизоотической ситуации в Республике Дагестан в 2015 году. Изложен анализ данных МЭБ о вспышках нодулярного дерматита на территории субъектов Российской Федерации в 2016 году. Обобщен опыт ликвидации очага нодулярного дерматита в крупном молочном комплексе в Тбилиском районе Краснодарского края.

**Ключевые слова:** нодулярный дерматит, крупный рогатый скот, ликвидация очага, промышленный молочный комплекс, экономический ущерб, Краснодарский край, вакцинация.

Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (заразный узелковый дерматит, кожная бугорчатка, узелковая экзантема, *Dermatitis nodulares*, Lumpy skin disease) — высококонтагиозная трансграничная эмерджентная вирусная болезнь, характеризующаяся персистентной лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (бугорков), поражением глаз и слизистых оболочек органов дыхания и пищеварения. У отдельных животных регистрируются симптомы бронхопневмонии. Возбудителем нодулярного дерматита является ДНК-содержащий оболочечный вирус, относящийся к группе Neethling, рода *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*. Нодулярный дерматит включен в список МЭБ, поэтому подлежит обязательной нотификации [6, 13]. В США возбудители, относящиеся к роду *Capripoxvirus*, классифицируются как потенциальные агенты для агротерроризма [20]. Вирус Neethling является прототипным возбудителем нодулярного дерматита. Этот патоген имеет антигенное родство с вирусом оспы овец и коз. Согласно Ко-

дексу здоровья наземных животных МЭБ (2016), заболеваю нодулярным дерматитом подвержен крупный рогатый скот (*Bos taurus*, *Bos indicus*), а также азиатские буйволы [2]. Человек к вирусу нодулярного дерматита не восприимчив [6].

Воротами инфекции при нодулярном дерматите являются кожа, слизистая органов дыхания и пищеварения, а также конъюнктивы глаз, из которых вирус переносится по лимфатическим сосудам в лимфатические узлы, там размножается и с током крови разносится по организму, вызывая специфические для болезни узелковые поражения [9, 18]. Нодулярный дерматит может проявляться как в острой, так и в хронической форме [6]. Распространение вируса нодулярного дерматита за пределы эпизоотического очага возможно двумя путями:

1) зараженными животными и особями, находящимися в инкубационном периоде, активными продуцентами возбудителя. В этом случае источник инфекции выполняет функции не только выделителя, но и распространителя вируса на большие расстояния. Распространение заболевания чаще всего бывает

Таблица 1

Характеристика эпизоотической ситуации по нодулярному дерматиту в Тляринском районе Республики Дагестан в июле 2015 г.

Населенные пункты	Количество КРС	Заболело	
		Количество (гол.)	%
1	162	8	4,94
2	87	5	5,75
3	96	5	5,21
4	471	10	2,12
5	149	6	4,03
6	210	9	4,29
7	19	1	5,26
8	128	5	3,91
Всего	1322	49	3,71

связано с перегоном скота [1, 6, 13]. Статуса вирусносительства при нодулярном дерматите не установлено [1].

2) пассивными (механическими) промежуточными переносчиками вируса: контаминированные продукты животноводства, корма, обслуживающий персонал, транспортные средства, животные и предметы ухода за ними. Доказаны факты механического переноса вируса кровососущими насекомыми, в том числе мухами, клещами, и воздушными потоками [1, 21, 22]. Данные о размножении возбудителя в клетках органов дыхания КРС свидетельствуют о значительной роли аэрогенного (воздушно-капельного) механизма передачи инфекции. Нельзя исключать и возможность воздушно-пылевого и гемоконтактного механизмов заражения. Ряд исследователей считают, что нодулярный дерматит является облигатным трансмиссивным заболеванием [3, 13, 15]. Однако в указанных источниках литературы отсутствуют данные о важнейших компонентах трансмиссии: векторной компетентности и векторной способности насекомых, переносчиков вируса нодулярного дерматита [5]. Все это подтверждает сообщения ряда исследователей о том, что кровососущие насекомые, а также мухи и клещи играют роль только механических переносчиков вируса [1, 16, 21, 22].

Инфекционные болезни животных, при которых патологический процесс регистрируется в различных органах респираторного тракта, относятся к группе аэрогенных инфекций. Эти болезни характеризуются высокой степенью контагиозности и аэрогенной трансмиссией возбудителей [12]. Больные животные с поражением респираторного тракта при дыхании, кашле

или чихании со слюной выделяют большое количество вируса, который длительное время может сохраняться во взвешенном состоянии и распространяться на большие расстояния. Органы дыхания, в числе прочих ворот инфекции, являются чрезвычайно уязвимыми, к чему предрасполагают их анатомо-физиологические особенности. Дыхательные пути вынужденно открыты для внешних воздействий, а легкие имеют огромную суммарную поверхность.

Нодулярный дерматит наносит значительный экономический ущерб, так как вызывает снижение удоя молока, аборт коров и нетелей, маститы, временную или постоянную стерильность быков-производителей, потерю живой массы, повреждение кожи, хромоту вследствие воспалительных процессов и отека ног, а также гибель больных животных, вызванную секундарной инфекцией [1, 19]. Например, в случае заноса нодулярного дерматита на территорию Украины и развития ситуации по негативному прогнозу ориентировочная потеря промышленного стада КРС в хозяйствах составит: падеж продуктивных животных — 40–70%; пожизненное снижение продуктивности — 30–40%; гибель телят — до 90%; полная утилизация молока в период карантина — 28 дней [8]. Другие исследователи считают, что нодулярный дерматит приводит к снижению экономической эффективности скотоводства на 45–65% [20].

Длительное время основным нозоареалом нодулярного дерматита КРС были Центральная и Северная Африка. В последующем многолетним Востоком его распространения в странах Ближнего Востока было направление с юга на север-восток. Возможно, что этот феномен обусловлен реализацией программы

«Революция в скотоводстве» («livestock revolution») путем создания в относительной близости от РФ и ЕС так называемого «Евразийского коридора жвачных» (Eurasian ruminant street), от Восточно-Средиземно-морского бассейна до Центральной Азии, включая территории Турции, Ирана, Пакистана, Афганистана, Аравийского полуострова. При этом неизбежно увеличение поголовья животных и создание условий для инкубации различных патогенов [4]. В 2013 г. болезнь регистрировалась в Израиле, Ливане, Иордании, Палестине, Ираке и Египте. В 2014 г. нодулярный дерматит был выявлен в Турции, Ливане, Азербайджане, Ираке, Египте, Иране. В 2014–2015 гг. болезнь была диагностирована на Кипре и в Греции. В период с 2013 по 2015 гг. нодулярный дерматит распространился на территории 12 стран Ближнего Востока. Все это свидетельствует о том, что нодулярный дерматит эндемичен в Африке и на Ближнем Востоке, а в последние годы вспышки начали регистрировать в Сирии, Турции, Израиле, Иордании, Ираке, Иране, Азербайджане и Кувейте [24]. По данным МЭБ, в Азербайджане нодулярный дерматит в 2014 г. регистрировался в 16 очагах четырех районов, расположенных на берегах реки Куры. Ветеринарные специалисты Азербайджана предполагают, что проникновение возбудителя на их территорию произошло в нейтральной зоне ирано-азербайджанской границы, где выпасался КРС. По данным СМИ, в 2014 г. нодулярный дерматит диагностировался у животных из 12 районов Азербайджана. Опубликованы данные о регистрации в Турции нодулярного дерматита у КРС, который выпасался на приграничных с Арменией и Грузией пастбищах [19]. По данным МЭБ, возможной причиной вспышек нодулярного дерматита в Турции может быть незаконное перемещение КРС [27].

Отсутствие контроля распространения инфекции в стране привело к заносу вируса на континентальную часть Европы. В 2015 г. нодулярный дерматит впервые был зарегистрирован на территории Греции. В течение года были выявлены 117 очагов инфекции. Ликвидация очагов болезни проводилась методом стемпинг аута, т.е. уничтожения всех восприимчивых животных. Несмотря на принятые меры, нодулярный дерматит регистрировали в стране и в 2016 г. Наряду с Грецией очаги инфекции были выявлены в Болгарии и Македонии [11]. В Болгарии первые случаи заболевания КРС нодулярным дерматитом были зарегистрированы в регионах, расположенных в центре страны. Все это послужило болгарским специалистам основанием для предположений о том, что нодулярный дерматит на территорию страны был занесен преднамеренно [25]. В последующем вспышки нодулярного дерматита были выявлены и в других странах Юго-Восточной Европы (Сербия, Македония, Албания, Косово и др.). Все эти факты свидетельствуют о низкой эффективности используемых мер борьбы и профилактики нодулярного дерматита. В начале декабря 2015 г. заболевание было обнаружено у КРС в Сюникской области Армении, приграничной с провинцией Восточный Азербайджан Исламской Республики Иран [11]. В начале ноября 2016 г. заболевание нодулярным дерматитом было зарегистрировано у КРС, принадлежащего жителям двух приграничных с Россией населенных пунктов провинции Рача-Лечхуми и Квемо-Сванети Грузии [26].

Данные МЭБ о распространении нодулярного дерматита КРС на территории Ближнего Востока, Турции, Ирана и Азербайджана явились основанием для про-

гнозирования большой вероятности заноса возбудителя на территорию Российской Федерации [7, 13, 17].

В июле 2015 г. у свободно выпасавшегося на горных пастбищах КРС, принадлежащего жителям приграничного с Азербайджаном и Грузией Тляратинского района Республики Дагестан, был выявлен нодулярный дерматит [10, 13]. В сентябре–октябре 2015 г. было зарегистрировано заболевание взрослого КРС, принадлежащего жителям сел других районов Республики Дагестан. Характеристика патологического процесса при нодулярном дерматите КРС в Тляратинском районе Республике Дагестан [23] представлена в табл. 1.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что в стадах КРС, свободно выпасавшегося и принадлежащего жителям Тляратинского района, заболело 3,71 (2,12–5,26)% животных. В августе–октябре 2015 г. нодулярный дерматит был диагностирован у КРС, принадлежащего жителям Наурского, Надтеречного и Грозненского районов Чеченской Республики. В сентябре–октябре 2015 г. заболевание было выявлено и у КРС, принадлежащего жителям населенных пунктов Республики Северная Осетия – Алания [10, 14]. В последующем очаги нодулярного дерматита были выявлены и в других районах Республики Дагестан [14]. Характеристика эпизоотической ситуации по нодулярному дерматиту КРС приведена в табл. 2.

Анализируя эпизоотическую ситуацию по нодулярному дерматиту, ветеринарные специалисты Дагестана отмечают, что 110 (92,4%) очагов инфекции были зарегистрированы на равнинной северной части субъекта, в горной части болезнь выявлена в 9 случаях (7,6%). Наиболее интенсивный эпизоотический процесс был в Хасавюртовском (29 очагов), Гунибском (16), Лакском (11) и Кизилюртовском (10) районах. Среди животных Хунзахского района Кизилюртовской зоны отгонного животноводства нодулярный дерматит протекал в тяжелой форме с высоким уровнем летальности (7,7%) [14].

Представленные в табл. 3 данные свидетельствуют о том, что в 2016 г. заболевание КРС нодулярным дерматитом было зарегистрировано в 328 очагах из 72 (22,0%) районов 16 субъектов 4 федеральных округов РФ (Южный, Северо-Кавказский, Центральный и Приволжский). В табл. 4 приведены данные о количестве заболевшего нодулярным дерматитом КРС в хозяйствах с разной формой собственности.

Указанные показатели свидетельствуют о том, что в ЛПХ количество заболевших животных составляло 7,0 (0,2–100)%, а в СПК (ЗАО, КФХ, ОАО и др.) — 13,8 (1,0–100)%. О низком уровне (5–10%) заболеваемости КРС нодулярным дерматитом сообщили Македония, Болгария и Сербия [26]. Различия в уровне заболеваемости в разных хозяйствах, вероятно, можно объяснить разницей в плотности животных на территории обитания.

Возможно, одна из причин широкого распространения нодулярного дерматита в Российской Федерации — отсутствие правил (инструкции) по борьбе и профилактике данной инфекции. Сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» был подготовлен проект «Ветеринарных правил по борьбе и профилактике нодулярного дерматита», который в октябре 2015 г. был направлен в МСХ РФ.

В настоящее время существует несколько принципиальных схем борьбы с нодулярным дерматитом. В соответствии с одной схемой предусматривается использование модифицированного стемпинг аута, т.е. проводится убой больных и инфицированных жи-

Таблица 2

Характеристика эпизоотической ситуации по нодулярному дерматиту в Республике Дагестан в 2015 г. [14]

№№	Районы	дата	Зоны отгонного животноводства	Кол-во очагов	Заболело	
					гол.	%
1	Кумторкалинский	04.10.15	–	3	19	0,7
2	Хасавюртовский	11.11.15	–	29	323	1,1
3	Бабаюртовский	30.09.15	–	8	90	0,9
4	Кизлярский	09.11.15	–	4	242	2,2
5	Кизилюртовский	07.10.15	–	10	19	0,3
6	Тарумовский	28.10.15	–	3	3	0,3
7	Хунзахский	07.09.15	Кизилюртовский	1	91	0,7
8	Гергебильский	26.09.15	Кизилюртовский	3	78	3,2
9	Гунибский	04.10.15	Кизилюртовский	16	73	1,6
10	Цумадинский	04.10.15	Бабаюртовский	9	172	3,0
11	Ботлихский	10.11.15	Бабаюртовский	3	10	0,6
12	Казбековский	12.11.15	Бабаюртовский	2	6	0,3
13	Акушкинский	16.09.15	Бабаюртовский	7	7	0,5
14	Лакский	01.10.15	Бабаюртовский	11	409	3,7
15	Гумбетовский	02.10.15	Бабаюртовский	1	10	5,2
16	Рутульский	14.10.15	–	1	1	0,04
	Всего			111	1597	1,5

вотных, а также кольцевая вакцинация в угрожаемой зоне. Согласно другой проводится стемпинг аут, т.е. убой всех животных и проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. Во многих случаях проводятся ветеринарно-санитарные мероприятия и кольцевая вакцинация.

Вакцинация — это единственный эффективный способ борьбы с нодулярным дерматитом в странах (регионах), где данная болезнь является эндемичной. Все

коммерчески доступные вакцины для профилактики нодулярного дерматита основаны на использовании живых аттенуированных штаммов вирусов. Использование таких вакцин приводит к ограничениям на международную торговлю живыми животными и животноводческой продукцией [16].

Во второй половине мая 2016 г. у КРС на молочном комплексе им. Т.Г. Шевченко Тбилисского района Краснодарского края были зарегистрированы аборт 16 ко-

Таблица 3  
Данные о вспышках нодулярного дерматита на территории РФ в 2016 г.

№№	Субъекты РФ	Дата первого очага	Всего районов	Количество неблагополучных	
				районов	очагов
1	Астраханская обл.	15.06.16	11	7 (63,3%)	10
2	Волгоградская обл.	03.07.16	33	4 (12,1%)	9
3	Воронежская обл.	10.08.16	31	1 (3,2%)	1
4	Ростовская обл.	17.07.16	43	2 (4,7%)	5
5	Рязанская обл.	24.09.16	25	2 (8%)	2
6	Тамбовская обл.	27.08.16	23	1 (4,3%)	6
7	Самарская обл.	02.10.16	26	1 (3,7%)	5
8	Краснодарский край	25.05.16	38	4 (10,5%)	5
9	Ставропольский край	19.06.16	26	10 (38,5%)	30
10	Кабардино-Балкарская Республика	10.08.16	9	1 (11,1%)	1
11	Карачаево-Черкесская Республика	22.07.16	8	4 (50%)	10
12	Республика Адыгея	22.07.16	7	1 (14,3%)	1
13	Республика Дагестан	07.07.16	41	10 (24,4%)	39
14	Республика Ингушетия	01.07.16	4	3 (75%)	35
15	Республика Калмыкия	07.06.16	13	7 (53,3%)	57
16	Чеченская Республика	25.08.16	15	14 (93,3%)	112
	Всего		353	72 (22,0%)	328

ров. При выяснении причин абортов были выявлены поражения кожи, сходные с аналогичными, регистрируемыми при нодулярном дерматите. Сотрудниками ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» 25 мая 2016 г. были отобраны пробы патологического материала от больных коров. При исследовании в ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» и ФГБУ «ВНИИЗЖ» в пробах патологического

материала в полимеразной цепной реакции (ПЦР) был обнаружен геном вируса нодулярного дерматита КРС. При клиническом осмотре 1066 коров, размещенных в трех коровниках, было выявлено 478 (45,1%) животных с клиническими признаками нодулярного дерматита. Большой процент заболевших нодулярным дерматитом коров можно объяснить большой концентрацией животных на ограниченной террито-

Таблица 4  
Превалентность заболевшего нодулярным дерматитом КРС в 2016 г.

№№	Форма собственности	Количество	Среднее количество (%)
1	СПК	71	13,8 (1,0–100)
2	ЛПХ	87	7,0 (0,2–100)

ЛПХ — личное подсобное хозяйство;  
СПК — сельскохозяйственный производственный кооператив.

рии и аэрогенным распространением вируса. В связи с отсутствием утвержденных ветеринарных правил (инструкции) по борьбе и профилактике данной инфекции установить ограничительные мероприятия (карантин) не представлялось возможным. Для организации мероприятий по ликвидации нодулярного дерматита госветуправлением Краснодарского края был издан приказ «Об утверждении Плана организационно-хозяйственных, зоотехнических, ветеринарно-санитарных мероприятий в очаге заболевания заразным узелковым дерматитом на территории молочного комплекса ЗАО им. Т.Г. Шевченко и мероприятий по недопущению распространения заболевания на территории муниципального образования Тбилисский район». В план противоэпизоотических мероприятий были включены все основные этапы из проекта «Ветеринарных правил по борьбе и профилактике нодулярного дерматита...». Во время оздоровительных мероприятий ветеринарными специалистами были проведены следующие манипуляции:

- 1) кожный покров КРС, на котором были выявлены нодулы, наружно обрабатывался препаратом АСД (фракция 3);
  - 2) всем животным на комплексе внутримышечно был введен «Бициллин-5» в дозе 10000 ЕД/кг массы тела;
  - 3) всем животным был введен «Тривитамин А, Д, Е»;
  - 4) после снятия карантина все находящиеся на молочном комплексе 2579 голов КРС были иммунизированы вакциной из аттенуированного штамма «ВНИИЗЖ» вируса оспы овец, изготовленной ФГБУ «ВНИИЗЖ», в рекомендуемой дозе 3,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>2</sup>;
  - 5) всех животных обрабатывали инсектицидными препаратами «Проветрин 100» — 0,0125%, «Бутокс 50» — 0,005%;
  - 6) проведена дезинфекция животноводческих помещений 2%-ным раствором едкого натрия;
  - 7) территория фермы и животноводческие помещения подвергнуты дезинсекции следующими препаратами: «Цифокс» 0,04%, «Проветрин 100» 0,0125%, «Бутокс 50» 0,005%;
  - 8) молоко ежедневно обеззараживалось 1%-ным раствором формальдегида в течение 60 минут с последующей утилизацией;
  - 9) выпойка телят и молодняка проводилась пастеризованным молоком.
- При клиническом осмотре всего поголовья животных, проведенном 30 июня 2016 г., на молочном комплексе больных животных выявлено не было.

Прямой ущерб от нодулярного дерматита в ЗАО им. Т.Г. Шевченко составил более 10,6 млн рублей. Основной ущерб (92,93%) был получен от потери утилизированного молока.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее десятилетие нодулярный дерматит получил широкое и эндемичное распространение на Ближнем Востоке. В 2014 г. очаги нодулярного дерматита были зарегистрированы на территории Азербайджана. В июле 2015 г. были выявлены случаи заболевания КРС, принадлежащего жителям сел приграничных с Азербайджаном районов Республики Дагестан. В августе–ноябре 2015 г. были выявлены случаи заболевания нодулярным дерматитом КРС в Чеченской Республике и Республике Северная Осетия – Алания. Впервые в мире в 2015 г. очаги нодулярного дерматита были зарегистрированы на территории севернее 43° с. ш.

В начале декабря 2015 г. нодулярный дерматит КРС был обнаружен в Сюникской области Армении, приграничной с провинцией Восточный Азербайджан Исламской Республики Иран. В начале ноября 2016 г. заболевание нодулярным дерматитом было зарегистрировано у КРС, принадлежащего жителям двух приграничных с Россией населенных пунктов провинции Рача-Лечхуми и Квемо-Сванети Грузии. В 2016 г. первый случай заболевания КРС нодулярным дерматитом был зарегистрирован в молочном комплексе ЗАО им. Т.Г. Шевченко Тбилисского района Краснодарского края РФ. Прямые экономические убытки, связанные с ликвидацией болезни, составили более 10,5 млн рублей.

Всего в 2016 г. нодулярный дерматит был диагностирован в 328 очагах 72 районов из 16 субъектов четырех федеральных округов (Южный, Северо-Кавказский, Центральный и Приволжский). Очаги нодулярного дерматита в Тамбовской и Рязанской областях расположены севернее 53° с. ш. Такое стремительное распространение нодулярного дерматита можно объяснить высокой патогенностью вируса, многочисленными механизмами передачи возбудителя инфекции, несанкционированным ввозом КРС в регионах Российской Федерации. Усугубляют ситуацию отсутствие законных нормативных документов, регламентирующих правила борьбы и профилактики данной инфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дрю Т. Нодулярный дерматит: эмерджентная угроза в Российской Федерации // Актуальные ветеринарные аспекты молочного и мясного скотоводства: материалы конф. — Сочи, 2016.
2. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 2. Рекомендации по болезням Списка МЭБ и другим важным для международной торговли болезням / OIE. — 25-е изд. — Paris, France: OIE, 2016. — С. 676–679.
3. Колбасов Д.В. Трансмиссивные заболевания жвачных // Животноводство России. — 2013. — № 10. — С. 41–42.
4. Макаров В.В., Гулюкин М.И., Львов Д.К. Зооантропогенные ортобуньявирусы (*Orthobunyavirus, Bunyaviridae*) // Вопросы вирусологии. — 2016. — Т. 61, № 2. — С. 53–58.
5. Макаров В.В., Василевич Ф.И., Гулюкин М.И. Векторная компетентность и способность насекомых-переносчиков инфекций // Российский паразитологический журнал. — 2014. — № 3. — С. 38–47.
6. Мищенко А.В., Караулов А.К., Мищенко В.А. Нодулярный дерматит КРС // Ветеринария. — 2016. — № 4. — С. 3–6.
7. Мищенко А.В., Мищенко В.А. Эпизоотическая ситуация по трансграничным и экономически значимым инфекционным болезням КРС в России в 2013 году // Актуальные ветеринарные проблемы в молочном и мясном животноводстве: матер. конф. — Казань, 2014.
8. На проверку коров в Украине потратят \$350 млн. — URL: <http://meatinfo.ru/news/na-proverku-korov-v-ukraine-potratyat-350-mln-361704>.
9. Нодулярный дерматит КРС: характеристика возбудителя болезни, распространение, диагностика и меры борьбы (обзор литературы) / Н.И. Закутский, В.М. Балышев, С.Г. Юрков [и др.] // Ветеринарный врач. — 2016. — № 4. — С. 3–12.
10. О мероприятиях по организации борьбы с нодулярным дерматитом КРС, оспой овец и бруцеллезом животных в Республике Дагестан / М.Ш. Шапиев, М.Г. Газимагомедов, Г.Ш. Кабардиев [и др.] // Проблемы развития АПК региона. — 2016. — № 1(25). — С. 152–159.
11. О распространении нодулярного дерматита крупного рогатого скота в Европе и Средиземноморье. — URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/print/news/17007.html>.
12. Основы инфекционной иммунологии: учеб. пособие для вузов / В.В. Макаров [и др.]; Рос. ун-т дружбы народов, Всерос. НИИ защиты животных. — М.; Владимир: Фолиант, 2000. — 173 с.
13. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, А.В. Кононов [и др.] // Ветеринария Кубани. — 2015. — № 5. — С. 3–6.
14. Распространение и клиническое проявление нодулярного дерматита КРС в Республике Дагестан / М.Г. Газимагомедов, М.Ш. Шапиев, Н.Р. Будулов [и др.] // Ветеринария. — 2016. — № 8. — С. 11–13.
15. Результаты генодиагностики нодулярного дерматита в Дагестане и Чеченской Республике — первое официальное подтверждение болезни на территории Российской Федерации / М.В. Бирюченкова, А.М. Тимина, Н.Г. Зиняков [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 4(15). — С. 43–45.
16. Специфическая профилактика нодулярного дерматита КРС / О.Ю. Черных, А.В. Мищенко, В.А. Мищенко [и др.] // Ветеринария Кубани. — 2016. — № 3. — С. 3–5.
17. Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan / S. Zeynalova, K. Asadov, M. Vatani [et al.] // Front. Microbiol. — 2016. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01022>.
18. Lumpy Skin Disease / Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) // OIE. — 7th ed. — 2012. — P. 762–776.
19. Lumpy skin disease in Turkey (European side). Preliminary outbreak assessment. — URL: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/437163/poa-lumpy-skin-turkey-201506.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/437163/poa-lumpy-skin-turkey-201506.pdf).
20. ProMED-mail. — URL: <http://www.promedmail.org/post/4568938>.
21. Scientific Opinion on lumpy skin disease // EFSA J. — 2015. — Vol. 13 (1):3986.
22. Tuppurainen E.S.M., Oura C.A.L. Review: Lumpy skin disease: An emerging threat to Europe, the Middle East and Asia // Transbound. Emerg. Dis. — 2011. — Vol. 59. — P. 40–48.
23. World Organisation for Animal Health. — URL: <http://www.oie.int> (дата обращения: 02.10.15).
24. World Organisation for Animal Health. — URL: <http://www.oie.int> (дата обращения: 15.01.16).
25. <http://www.focus-fen.net/2016/04/27/404875/Bulgarian-expert-lumpy-skin-disease-infection-in-Bulgaria-may-be-done-on-propose.html>.
26. [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=21464](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=21464) (дата обращения: 08.11.16).
27. [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/534403/Update-lumpy-skin-se-europe.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/534403/Update-lumpy-skin-se-europe.pdf).

UDC 619:616.98:578.821.2.636.22/28

## PROBLEM OF LUMPY SKIN DISEASE OUTBREAK PREVENTION AND ERADICATION

R.A. Krivonos<sup>1</sup>, G.A. Dzhalidzhi<sup>2</sup>, A.V. Mischenko<sup>3</sup>, V.A. Mischenko<sup>4</sup>, O.Yu. Chernykh<sup>5</sup>, V.N. Shevkopyas<sup>6</sup>, S.G. Dresvyannikova<sup>7</sup>, D.V. Kolomiets<sup>8</sup>, S.V. Tikhonov<sup>9</sup><sup>1</sup>Deputy Head, National Veterinary Department of the Krasnodar Krai, Krasnodar, e-mail: sinkubani@mail.ru<sup>2</sup>Head, Candidate of Science (Biology), National Veterinary Department of the Krasnodar Krai, Krasnodar, e-mail: uv@krasnodar.ru<sup>3</sup>Deputy Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mischenko@arriah.ru<sup>4</sup>Chief Researcher, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mishenko@arriah.ru<sup>5</sup>Director, Doctor of Science (Veterinary Medicine), GBI KK «Kropotkin Krai Veterinary Laboratory», Kropotkin, e-mail: gukkvl50@kubanvet.ru<sup>6</sup>Director, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Department of Veterinary Medicine, RF Ministry of Agriculture, Moscow, e-mail: shevkopyasvn@gmail.com<sup>7</sup>Head, Candidate of Science (Veterinary Medicine), GKU KK KSBZBh, Krasnodar, e-mail: kraivet.dsg@mail.ru<sup>8</sup>Head of the Department, National Veterinary Department of the Krasnodar Krai, Krasnodar<sup>9</sup>Chief Veterinarian, Candidate of Science (Biology), GKU KK KSBZBh, Krasnodar, e-mail: tikhonov14@mail.ru

## SUMMARY

The paper presents data on lumpy skin disease spread in the Russian Federation, Middle East, Azerbaijan, Armenia, Georgia, Greece, Bulgaria, Macedonia, Serbia, Albania, and Kosovo. It characterizes epidemic situation in the Republic of Dagestan in 2015. It also gives analysis of the OIE data on lumpy skin disease outbreaks in the Russian Federation in 2016. The paper summarizes experience in LSD outbreak eradication in a large dairy establishment in Tbilisi Rayon of the Krasnodar Krai.

Key words: lumpy skin disease, cattle, outbreak eradication, dairy establishment, economic losses, Krasnodar Krai, vaccination.

Lumpy skin disease (*Dermatitis nodularis*, LSD) is a highly contagious transboundary emerging viral disease characterized by persistent fever, swollen lymph nodes, edema of subcutaneous connective tissue and internal organs, development of skin nodules (lumps), eye lesions, lesions in the mucous membranes of respiratory organs and gastrointestinal tract. Some animals demonstrate symptoms of bronchial pneumonia. Lumpy skin disease is caused by enveloped DNA virus of the Neethling type of the genus *Capripoxvirus*, the family *Poxviridae*. Lumpy skin disease is included in the OIE list of notifiable diseases [6, 13]. In the USA pathogens of the genus *Capripoxvirus* are classified as potential disease agents of agroterrorism [20]. The prototype strain of LSD virus (LSDV) is the Neethling virus. The pathogen is antigenically similar to pox virus of sheep and goats. According to the OIE Terrestrial Animal Health Code (2016) LSDV susceptible animals include cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and Asian water

buffalo [2]. LSDV is not transmissible to humans.

The portals of entry for LSDV infection are skin, mucous membranes of respiratory organs and gastrointestinal tract, conjunctiva carrying the virus to lymph nodes through the lymphatic system, where the virus propagates and is carried throughout the organism, causing disease-specific nodular lesions [9, 18]. LSD can result in either acute infection or chronic infection [6]. There are two routes of LSDV transmission outside the outbreak:

1) via infected animals and animals during the incubation period, actively excreting the virus. In this case the source of infection functions not only as an excreter but also as a virus carrier over long distances. The LSDV spread is likely to be related to cattle drive [1, 6, 13]. No carrier state in animals for LSD has been reported [1].

2) via passive (mechanical) intermediate virus vectors – contaminated livestock products, feeds, personnel, transport vehicles, animals and animal care products. It has been proved that LSDV can be mechanically

Table 1  
LSD epidemic situation in Tlyaratinsky Raion, Republic of Dagestan, July 2015

Settlements	Cattle number	Diseased animals	
		Number (animals)	Percent
1	162	8	4.94
2	87	5	5.75
3	96	5	5.21
4	471	10	2.12
5	149	6	4.03
6	210	9	4.29
7	19	1	5.26
8	128	5	3.91
Total	1322	49	3.71



### Вакцины производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» против болезней КРС:

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

### Диагностические услуги

- индикация в полимеразной цепной реакции (ПЦР) геномов вирусов и бактерий;
- серологические исследования (ИФА, РТГА, РСК, РДП и др.) с использованием тест-систем отечественного и импортного производства;
- определение антител к вирусу ящура типов А22, О1, С1, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3 в реакции микронейтрализации;
- определение антигена ротавируса КРС группы А в ИФА;
- определение антител к вирусу лейкоза КРС в реакции иммунодиффузии (РИД);
- бактериологическое исследование патологического материала с выделением и идентификацией возбудителя семейств *Enterobacteriaceae* и *Pasteurellaceae*;
- лабораторная диагностика губкообразной энцефалопатии КРС гистологическим и иммунологическим методами.

По вопросам проведения исследований обращаться по тел.: 8-4922-26-15-25 (доб. 2135)



Table 2  
LSD epidemic situation in the Republic of Dagestan, 2015 [14]

No	Raions	Date	Transhumance zones	Outbreak number	Diseased	
					гол.	%
1	Kumtorkalisky	04.10.15	-	3	19	0.7
2	Khasavyurtovsky	11.11.15	-	29	323	1.1
3	Babayurtovsky	30.09.15	-	8	90	0.9
4	Kizlyarsky	09.11.15	-	4	242	2.2
5	Kizilyurtovsky	07.10.15	-	10	19	0.3
6	Tarumovsky	28.10.15	-	3	3	0.3
7	Khuzakhsky	07.09.15	Kizilyurtovsky	1	91	0.7
8	Gergebilsky	26.09.15	Kizilyurtovsky	3	78	3.2
9	Gunibsky	04.10.15	Kizilyurtovsky	16	73	1.6
10	Tsumadinsky	04.10.15	Babayurtovsky	9	172	3.0
11	Botlikhsky	10.11.15	Babayurtovsky	3	10	0.6
12	Kazbekovsky	12.11.15	Babayurtovsky	2	6	0.3
13	Akushkinsky	16.09.15	Babayurtovsky	7	7	0.5
14	Laksky	01.10.15	Babayurtovsky	11	409	3.7
15	Gumbetovsky	02.10.15	Babayurtovsky	1	10	5.2
16	Rutulsky	14.10.15	-	1	1	0.04
	Total			111	1597	1.5

transmitted through air and by bloodsucking insects, including flies and ticks [1, 21,22]. Data on virus growth in cells of respiratory organs demonstrate that aerogenic (air-borne) virus transmission mechanism plays a significant role. The possibility of transmission mechanism by air and dust, as well as by contact with blood can't be excluded. Some authors consider that lumpy skin disease is an obligate transmissible disease [3, 13, 15]. However, references given in the paper lack data on the most important transmission components: vector competence and vector ability of insects being the LSDV transmission vectors [5]. That confirms reports of some authors that bloodsucking insects, including flies and ticks, play the role of mechanical transmission vectors [1, 16, 21, 22].

Infectious animal diseases with the pathological process registered in different organs of the respiratory system are considered aerogenic infections. These diseases are characterized by high contagiousity and aerogenic virus transmission [12]. During breathing, coughing, sneezing animals with infected respiratory tract excrete large amounts of the virus that may retain in the suspended state and spread over long distances. Among other portals of entry, respiratory organs are extremely vulnerable due to their physiological characteristics. Air passages are involuntarily exposed to external factors and lungs have a large surface area.

Lumpy skin disease results in significant economic losses as it causes decrease in milk production, abortions

in cows and heifers, mastitis, temporary or permanent sterility in servicing bulls, mass loss, skin lesions, lameness due to inflammation and edema of limbs, as well as death of infected animals caused by secondary bacterial infection [1, 19]. For instance, in case of LSD introduction in the territory of Ukraine and negative development of the epidemic situation, the approximate losses in productive herds are estimated as follows: death of productive cattle — 40-70%; lifelong production decrease — 30-40%; death of calves — up to 90%; complete disposal of milk from quarantined herds — 28 days [8]. Other authors consider that lumpy skin disease causes 45-65% decrease in economic effectiveness of livestock production [20].

For many years LSD occurrence was limited to Central and North Africa. Subsequently the multi-year trend was LSDV spreading mainly in the Middle East region from south to north-east. This can be explained by implementation of the 'Livestock Revolution' programme. Under this programme, the so called 'Eurasian ruminant street' was established in the relative proximity to the RF and the EC, covering the territory from the Eastern Mediterranean Region to Central Asia, including Turkey, Iran, Pakistan, Afghanistan, the Arabian Peninsula. In this regard it is inevitable that livestock population increases and conditions are created for occurrence of different pathogens [4]. In 2013 the disease was registered in Israel, Lebanon, Jordan, Palestine, Iraq and Egypt. In 2014 LSD was detected in Turkey, Lebanon, Azerbaijan, Iraq, Egypt,

Table 3  
LSD outbreaks in the RF in 2016

No	RF Subjects	First outbreak date	Total number of raions	Number of affected	
				raions	settlements/areas
1	Astrakhan Oblast	15.06.16	11	7 (63.3%)	10
2	Volgograd Oblast	03.07.16	33	4 (12.1%)	9
3	Voronezh Oblast	10.08.16	31	1 (3.2%)	1
4	Rostov Oblast	17.07.16	43	2 (4.7%)	5
5	Ryazan Oblast	24.09.16	25	2 (8%)	2
6	Tambov Oblast	27.08.16	23	1 (4.3%)	6
7	Samara Oblast	02.10.16	26	1 (3.7%)	5
8	Krasnodar Oblast	25.05.16	38	4 (10.5%)	5
9	Stavropolsky Krai	19.06.16	26	10 (38.5%)	30
10	Kabardino-Balkar Republic	10.08.16	9	1 (11.1%)	1
11	Karachai-Cherkess Republic	22.07.16	8	4 (50%)	10
12	Republic of Adygeya	22.07.16	7	1 (14.3%)	1
13	Republic of Dagestan	07.07.16	41	10 (24.4%)	39
14	the Republic of Ingushetia	01.07.16	4	3 (75%)	35
15	Republic of Kalmykia	07.06.16	13	7 (53.3%)	57
16	Chechen Republic	25.08.16	15	14 (93.3%)	112
	Total: 16		353	72 (22.0%)	328

Iran. In 2014-2015 the disease was diagnosed in Cyprus and Greece. In 2013-2015 LSD spread in 12 countries in the Middle East. The data indicate that LSD is endemic in Africa and the Middle East and lately it has been reported in Syria, Turkey, Israel, Jordan, Iraq, Iran, Azerbaijan and Kuwait [24]. According to OIE there were 16 LSD outbreaks in 4 regions on the River Kura in Azerbaijan in 2014. Veterinary experts of Azerbaijan assume that LSD virus entered the territory through cattle grazing pastures in the neutral zone of the Iran-Azerbaijan boarder. According to media sources, LSD was diagnosed in cattle in 12 regions of Azerbaijan. LSD cases were reported in cattle grazing in pastures near the border with Armenia and Georgia [19]. According to the OIE, the LSD outbreaks in Turkey were possibly caused by illegal cattle movement [27].

Lack of infection control in the country led to LSD introduction in continental Europe. In 2015 LSD was first registered in Greece. 117 LSD outbreaks were reported throughout the year. The outbreaks were eliminated by stamping-out measures, i.e. immediate slaughter of all susceptible animals. LSD was also reported in the country in 2016 despite all the measures taken. Besides Greece, LSD outbreaks were also registered in Bulgaria and Macedonia [11]. In Bulgaria first LSD cases were registered in central regions. That served a basis for Bulgarian experts to make a supposition that LSD was introduced intentionally [25]. Subsequently LSD outbreaks were registered in other South-Eastern countries (Serbia, Macedonia, Albania,

Kosovo etc.). All these facts indicate low effectiveness of LSD control and prevention measures. In early December, 2015 LSD cases occurred in Syuniksk Oblast (Armenia) that borders with East Azerbaijan Province in the Islamic Republic of Iran [11]. In early November, 2016 LSD was diagnosed in cattle owned by two residents of two settlements Racha-Lechkhumi and Kvemo-Svaneti located in Georgia near the RF border [26].

OIE data on LSD spread in the Middle East, Turkey, Iran and Azerbaijan served a basis for predicting high probability of LSDV introduction in the Russian Federation [7, 13, 17].

In July 2015 LSD was diagnosed in free-ranging herds grazing in mountain pastures and belonging to residents of the settlements in the Tlyaratinsky Raion of the Republic of Dagestan near the border with Azerbaijan and Georgia [10, 13]. In September-October 2015 LSD was diagnosed in mature cattle owned by residents of settlements from other regions of Dagestan. The data on LSD epidemic situation in the Tlyaratinsky Raion, the Republic of Dagestan [23] is given in Table 1.

The data given in Table 1 demonstrate that 3.71 (2.12-5.26)% of animals of free-ranging herds and herds belonging to Tlyaratinsky Raion residents got diseased. In August-October 2015 lumpy skin disease was reported in cattle belonging to residents of Naursky, Nadterechny and Grozny Raions of the Chechen Republic. In September-October 2015 the disease was reported in cattle

Table 4  
LSD diseased cattle prevalence, 2016

No	Property ownership type	Number	Average number (%)
1	APC	71	13,8 (1,0-100)
2	BF	87	7,0 (0,2-100)

BF – backyard farm;  
APC – Agricultural production cooperative

belonging to residents of settlements of the Republic of North Ossetia-Alania [10, 14]. Later LSD outbreaks were reported in other raions of the Republic of Dagestan [14]. Table 2 characterizes LSD epidemic situation in cattle.

Analyzing the LSD epidemic situation veterinary specialists from Dagestan state that 110 (92.4%) outbreaks of the infection were reported in the flatland part of the northern territory of the Subject while in the mountainous part 9 disease cases were reported (7.6%). Epidemic processes were most intensive in Khasavyurtovsky Raion (29 outbreaks), Gunibsky Raion (16), Laksky Raion (11), and Kizilyurtovsky Raion (10). Severe disease with high mortality level (7.7%) was observed in animals of the Khuzakhsky Raion of the Kizilyurtovsky transhumance zone [14].

The data given in table 3 demonstrate that in 2016 LSD was reported in 328 areas/settlements of 72 (22.0%) raions, 16 subjects, four federal districts (Southern, North-Caucasia, Central, and Privolzhsky) of the RF. Table 4 demonstrates data on the number of LSD diseased cattle on farms of different property ownership types.

These data demonstrate that the number of diseased animals on backyard farms was 7.0 (0.2-100)%, and in APC (ZAO, farm holdings, OAO, etc.) – 13.8 (1.0-100)%. Macedonia, Bulgaria, and Serbia informed about low LSD morbidity level of (5-10%) [26]. The differences in the morbidity level on different farms can probably be explained by the difference in the animal density in their habitat.

Apparently, one of the reasons for LSD wide spread in the Russian Federation is lack of regulations on the infection control and prevention. The FGBI «ARRIAH» specialists developed Draft veterinary rules on lumpy skin disease control and prevention, which were submitted to the Ministry of Agriculture in October, 2015.

Today there are several basic methods of LSD control. One method provides modified stamping out i.e. destruction of diseased and infected animals as well as ring vaccination in the containment zone. The other one suggests stamping out, i.e. destruction of all animals and performing veterinary and sanitary measures. Veterinary and sanitary measures as well as ring vaccination are frequently performed.

Vaccination is the only effective way to control lumpy skin disease in the countries (subjects) where the disease is endemic. All commercially available vaccines for LSD prevention are based on the live attenuated virus strains. Application of such vaccines leads to restrictions on international trade in live animals and animal products [16].

In the second half of May, 2016, abortions in 16 cows were reported on the dairy farm named after T.G. Shevchenko, Tbilissky Raion, Krasnodarsky Krai.

The investigation of the abortion causes revealed skin lesions similar to those characteristic of lumpy skin disease. Specialists of the GBI «Kropotkinsky Regional Veterinary Laboratory» sampled pathological material from diseased cows on May 25, 2016. Tests of pathological material samples performed in the GBI «Kropotkinsky Regional Veterinary Laboratory» and FGBI «ARRIAH» using PCR detected LSD virus genome. Clinical examination of 1,066 cows kept in three barns revealed 478 (45,1%) animals demonstrating LSD clinical signs. Large proportion of LSD diseased animals can be explained by high density of animals and air-borne virus transmission. Due to the lack of approved veterinary rules (instruction) on the infection control and prevention it is impossible to take restrictive measures (quarantine). To carry out measures aimed at lumpy skin disease eradication the State Veterinary Department of the Krasnodarsky Krai issued an Act on approving the plan of administrative, zootechnic, veterinary and sanitary measures in the LSD outbreak on ZAO after T.G. Shevchenko and measures for the disease spread and prevention in the territory of the Tbilisski Raion municipal entity. The plan of anti-epidemic measures included all major steps of the Draft veterinary rules on lumpy skin disease control. The veterinary specialists performed the following health improvement measures:

- 1) cattle skin with nodules was treated with ASD (fraction 3);
- 2) all animals on the farm were intramuscularly injected with Bicillin-5 at a dose of 10000 U/kg of the body weight;
- 3) all animals were administered with Trivitamin A, D, E;
- 4) after the quarantine lifting all 2,579 animals kept on the farm were immunized with the vaccine based on the ARRIAH attenuated sheep pox virus strain, produced by the FGBI «ARRIAH» at a recommended dose of 3,5 lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>;
- 5) all animals were treated with the following insecticides: «Provectrin 100» – 0.0125%, «Butox 50» – 0.005%;
- 6) animal facilities were disinfected using 2% sodium hydroxide solution;
- 7) the territory of the farm and facilities were subject to desinsection using «Cifox» 0.04%, «Provectrin 100» 0.0125%, «Butox 50» 0.005%;
- 8) the milk was daily disinfected with 1% formaldehyde solution within 60 minutes;
- 9) calves and young animals were fed with pasteurized milk.

During clinical examination of the entire animal population performed on June 30, 2016 on the dairy farm no diseased animals were detected.

Direct losses of the LSD outbreak on ZAO after Shevchenko exceeded 10.6 million rubles. Major damage (92.93%) was due to the milk disposed.

## CONCLUSION

Within the last decade lumpy skin disease has widely spread in the Middle East. In 2014 LSD outbreaks were reported in Azerbaijan. In July 2015 the disease was detected in cattle belonging to raions of the Republic of Dagestan neighboring Azerbaijan. In August-November 2015 LSD was reported in the Chechen Republic and the Republic of North Ossetia-Alania. For the first time LSD outbreaks were reported to the north of 43 degrees north latitude.

At the beginning of December 2015 LSD was reported in Syunik Oblast, Armenia bordering East Azerbaijan Province of Iran. At the beginning of 2016 the disease was reported in cattle belonging to residents of two settlements of Racha-Lechkhumi province and Kvemo-Svanetti province, Georgia, bordering Russia. In 2016 the first LSD disease case was reported in the dairy farm ZAO after T.G. Shevchenko, Tbilissky Raion, Krasnodarsky Krai, RF. Direct losses associated with the disease eradication exceeded 10.5 million rubles.

All in all in 2016 LSD was diagnosed in 328 settlements/ areas, 72 raions, 16 subjects of the four federal districts (Southern, North-Caucasia, Central, and Privolzhsky). The LSD outbreaks in Tambov and Ryazan Oblasts are located to the north of 53 degrees north latitude. Such rapid disease spread can be explained by high pathogenicity of the virus, multiple routes of the infection agent transmission, illegal import of cattle to the RF Subjects. The situation is aggravated due to the lack of regulatory documents governing rules of the infection control and prevention.

## BIBLIOGRAPHY

1. Drew T. Lumpy skin disease: an emerging threat to the Russian Federation // Topical veterinary aspects of dairy and meat animal husbandry: conference materials. — Sochi, 2016.
2. Terrestrial Animal Code V. 2. Recommendations on the OIE listed diseases and other diseases of importance to international trade / OIE. — 25 ed. — Paris, France: OIE, 2016. — P. 676-679.
3. Kolbasov D.V. Transmissible ruminant diseases // Livestock in Russia. — 2013. — No 10. — P. 41-42.
4. Makarov V.V., Gulyukin M.I., L'vov D.K. Zoopathogenic Orthobunyaviruses (Orthobunyavirus, Bunyaviridae) // Virology aspects. — 2016. — Vol. 61, No 2. — P. 53-58.
5. Makarov V.V., Vasilyevich F.I., Gulyukin M.I. Vector competence and capacity of insect carriers of infections // Russian journal of parasitology. — 2014. — No 3. — P. 38-47.
6. Mischenko A.V., Karaulov A.K., Mischenko V.A. Lumpy skin disease // Veterinary Medicine. — 2016. — No 4. — P. 3-6.
7. Mischenko V.A., Mischenko A.V. Epidemic situation of transboundary and economically significant infectious cattle diseases in Russia in 2013 // Topical veterinary aspects of dairy and meat animal husbandry: conference materials. — Kazan, 2014.
8. 350 million dollars will be spent on cow inspection in Ukraine — URL: <http://meatinfo.ru/news/na-proverku-korov-v-ukraine-potratyat-350-mln-361704>.
9. Lumpy skin disease: characteristics of the disease agent, spread, diagnosis, prevention and control measures (literature review) / N.I. Zakutsky, V.M. Balyshov, S.G. Yurkov, et al. // Veterinarian. — 2016. — No 4. — P. 3-12.
10. Measures for LSD, sheep pox and brucellosis control in the Republic of Dagestan / M.Sh.Shapiyev, M.G. Gazimagometov, G.Sh. Kabardiyev [et al.] // Problems of agricultural sector development in the region — 2016. — No 1 (25). — P. 152-159.
11. LSD spread in Europe and Mediterranean — URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/print/news/17007.html>.
12. Basics of infectious immunology: textbook for colleges / V.V. Makarov [et al.]; Peoples' Friendship University, All-Russian Research Institute for Animal Health. — M.; Vladimir: Foliant, 2000. — P. 173.
13. Lumpy skin disease problem / A.V. Mischenko, V.A. Mischenko, A.V. Kononov [et al.] // Veterinary medicine of Kuban'. — 2015. — No 5. — P. 3-6.
14. LSD spread and clinical manifestation in the Republic of Dagestan / M.G. Gazimagomedov, M.Sh. Shapiyev, N.R. Budulov [et al.] // Veterinary Medicine. — 2016. — No 8. — P. 11-13.
15. Results of LSD gene diagnostics in Dagestan and Chechen Republic — first official confirmation of the disease in the Russian Federation / M.V. Biryuchenkova, A.M. Timina, N.G. Zinyakov [et al.] // Veterinary today. — 2015. — No 4 (15). — P. 43-45.
16. Specific prevention of lumpy skin disease / O.Yu. Chernykh, A.V. Mischenko, V.A. Mischenko [et al.] // Veterinary Medicine of Kuban'. — 2016. — No 3. — P. 3-5.
17. Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan / S. Zeynalova, K. Asadov, M. Vatani [et al.] // Front. Microbiol. — 2016. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01022>.
18. Lumpy Skin Disease / Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) // OIE. — 7th ed. — 2012. — Vol. 1, Chap. 2.4.14. — P. 762-776.
19. Lumpy skin disease in Turkey (European side). Preliminary outbreak assessment. — URL: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/437163/poa-lumpy-skin-turkey-201506.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/437163/poa-lumpy-skin-turkey-201506.pdf).
20. ProMED-mail. — URL: <http://www.promedmail.org/post/4568938>.
21. Scientific Opinion on lumpy skin disease // EFSA J. — 2015. — Vol. 13 (1):3986.
22. Tuppurainen E.S.M., Ours C.A.L. Review: Lumpy skin disease: An emerging threat to Europe, the Middle East and Asia // Transbound. Emerg. Dis. — 2011. — Vol. 59. — P. 40-48.
23. World Organisation for Animal Health. — URL: <http://www.oie.int> (дата обращения: 02.10.15).
24. World Organisation for Animal Health. — URL: <http://www.oie.int> (дата обращения: 15.01.16).
25. <http://www.focus-fen.net/2016/04/27/404875/Bulgarian-expert-lumpy-skin-disease-infection-in-Bulgaria-may-be-done-on-propose.html>.
26. [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=21464](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=21464) (дата обращения: 08.11.16).
27. [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/534403/Update-lumpy-skin-se-europe.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/534403/Update-lumpy-skin-se-europe.pdf).

## ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ПИТАТЕЛЬНОЙ РОСТОВОЙ СРЕДЕ НА РЕПРОДУКЦИЮ КЛЕТОК ЛИНИИ ВНК-21/2-17 И ВИРУСА ЯЩУРА

М.А. Шевченко<sup>1</sup>, М.И. Доронин<sup>2</sup>, Н.Д. Клюкина<sup>3</sup>, А.А. Шишкова<sup>4</sup>, Д.А. Лозовой<sup>5</sup>, Д.В. Михалишин<sup>6</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shishkova@arriah.ru

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

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

### РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения влияния разного количества сыворотки крови крупного рогатого скота на производственный процесс суспензионного культивирования клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура.

Ключевые слова: стерильная сыворотка крови крупного рогатого скота, обработанная полиэтиленгликолем сыворотка крови крупного рогатого скота, питательная ростовая среда, клеточная линия ВНК-21/2-17, репродукция вируса ящура.

## THE INFLUENCE OF CONCENTRATION OF BLOOD SERUM IN THE NUTRIENT GROWTH MEDIUM ON THE REPRODUCTION OF THE CELL LINE ВНК-21/2-17 AND FMD VIRUS

M.A. Shevchenko<sup>1</sup>, M.I. Doronin<sup>2</sup>, N.D. Klukina<sup>3</sup>, A.A. Shishkova<sup>4</sup>, D.A. Lozovoy<sup>5</sup>, D.V. Michalishin<sup>6</sup>

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

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

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

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

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

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

### SUMMARY

The paper presents results on the effect of different amount of blood serum of cattle in the production process of the suspension cultivation of cell line ВНК-21/2-17 and FMD virus.

Key words: sterile blood serum of cattle, treated with polyethylene glycol the blood serum of cattle, nutrient growth medium, cell line ВНК-21/2-17, reproduction of the virus of foot and mouth disease.

### ВВЕДЕНИЕ

Для репродукции вируса ящура и получения вирус-содержащего сырья, используемого в производстве противоящурных вакцин, применяют суспензионную перевиваемую культуру клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

Суспензионное культивирование клеток линии ВНК-21/2-17 в промышленных масштабах осуществляют с применением питательной ростовой среды, содержащей сыворотку крови крупного рогатого скота (КРС). Сыворотка является источником факторов

роста, липидов, гормонов, солей и других веществ, обеспечивающих пролиферацию и развитие клеток [5–7]. При этом следует отметить, что промышленные серии сывороток существенно отличаются друг от друга, поскольку изготавливаются из крови животных, различающихся по возрасту и массе, половым признакам и породе, физиологическому состоянию организма и типу высшей нервной деятельности, условиям содержания и кормления. Ряд авторов также показал зависимость компонентного состава сыворотки крови КРС от сезона и температуры окружающей среды [8]. Данные факторы оказывают влияние на состав сыворотки крови и вызывают существенные отличия их серий по биохимическим показателям, в частности по содержанию аминокислот, белков, липидов, углеводов, гормонов, микро- и макроэлементов [5, 6]. Содержание в питательной ростовой среде данных низко- и высокомолекулярных компонентов сыворотки влияет на пролиферативную активность и рост клеток линии ВНК-21/2-17 [6].

Существенным недостатком сывороток крови КРС является наличие в них ингибиторов роста, оказывающих отрицательное воздействие на процессы культивирования клеток и вируса [3, 6]. Кроме того, одним из факторов, ограничивающих применение сывороток при получении антигена вируса ящура в клетках линии ВНК-21/2-17, является наличие в их составе различных контаминантов и антител ко многим инфекционным агентам животных, в том числе к вирусу ящура, что может приводить к значительному снижению концентрации 146S-компонента вируса ящура и титра его инфекционной активности в культуре клеток ВНК-21/2-17 [9–12]. Для очистки сыворотки от  $\gamma$ -глобулинов, а также контаминирующих агентов Barteling S.J. с соавт. [12] предложили применять полиэтиленгликоль (ПЭГ) (6000 Да). ПЭГ представляет собой нетоксичный водорастворимый синтетический полимер, обладающий способностью неизбирательно связывать протеины [3, 13, 14]. Данная процедура очищения является достаточно трудоемким процессом по сравнению с получением стерильной нативной сыворотки. Кроме того, в научных публикациях приведены достаточно противоречивые сведения о влиянии ПЭГ на пролиферативный потенциал и развитие клеток [1, 5, 6, 13, 14]. Для суспензионного выращивания данной культуры клеток в производственных масштабах используют сыворотку крови КРС, свободную от противоящурных антител.

Цель исследования — оценить влияние содержания в питательной ростовой среде сыворотки крови КРС разной концентрации на производственный процесс репродукции клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточная линия.** В работе использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию ВНК-21/2-17, начиная с 7 пассажа, с посевной концентрацией  $(0,7–0,9) \times 10^6$  клеток/мл. Первые 6 пассажей проводили согласно технологическому процессу суспензионного выращивания клеток для дальнейшего культивирования вируса ящура.

**Оценка интенсивности роста и развития клеток.** Количество жизнеспособных клеток подсчитывали под микроскопом с помощью счетной камеры Горьева. Интенсивность роста и развития клеток оценивали по

индексу пролиферативной активности (ИПА), пользуясь формулой:  $ИПА = x/y$ , где  $x$  — общее количество выросших клеток,  $y$  — общее количество засеянных клеток.

**Питательная ростовая среда.** Для суспензионного культивирования клеток линии ВНК-21/2-17 применяли среду, содержащую необходимый набор солей, аминокислот и витаминов, в сочетании с 0,2% ферментативного гомогенизата и 2,5–5,0% сыворотки крови КРС (рН среды 7,0–7,2).

**Поддерживающая среда.** Для репродукции вируса ящура использовали среду, содержащую необходимый набор солей и аминокислот, с внесением 0,2% ферментативного гомогенизата (рН среды 7,7–7,8).

**Сыворотка крови КРС.** Для приготовления ростовой среды применяли сыворотку крови КРС стерильную 1 категории и сыворотку крови КРС, очищенную с помощью ПЭГ, взятые в соотношении 1:1. Оценку ростовых качеств сыворотки крови проводили по значению ИПА клеток линии ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде Игла, содержащей в своем составе 5% сыворотки. В дальнейшей работе для проведения исследований использовали сыворотки крови КРС тех промышленных серий, которые позволяли выращивать клетки с ИПА  $\geq 3,0$ . В работе использовали сыворотку крови, не содержащую антитела против вируса ящура.

**Культивирование клеток и вируса.** Выращивание суспензионной культуры клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура проводили в культиваторах металлических объемом 2000 дм<sup>3</sup>. Все производственные процессы осуществляли строго в соответствии с требованиями, отраженными в «Промышленном регламенте на производство вакцины против ящура сорбированной моно- и поливалентной (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21/2-17)».

**Вирус ящура.** Для заражения клеток линии ВНК-21/2-17 использовали следующие штаммы культурального вируса ящура: «О/Саудовская Аравия/08», «А/Турция/06», «А-Кути», «Asia-1/Shamir/3/89», депонированные в Коллекции штаммов микроорганизмов (КШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Определение концентрации иммуногенных компонентов в очищенной суспензии вируса ящура.** Количество иммуногенных компонентов (146S-частиц и комплекса 146S- и 75S-частиц) в суспензии вируса ящура определяли в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению содержания вирус-специфического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной реакции связывания комплемента (РСК)», утвержденной директором ВНИИИ в 1987 г. [2].

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка заключалась в определении средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера [4]. Построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ Stat Soft (версия 6.0) и Microsoft Excel 2010.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы оценивали влияние массовой доли сыворотки крови КРС в составе питательной ростовой среды на пролиферативный потенциал суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17. Для этого

Таблица 1  
Влияние содержания сыворотки крови КРС на суспензионное культивирование клеток линии ВНК 21/2-17 (n=9)

Содержание сыворотки крови КРС, %	№ пассажа	Концентрация клеток, 10 <sup>6</sup> клеток/мл		ИПА*
		после посева	окончание культивирования	
2,5	7	0,814±0,016 (p<0,001)	3,891±0,029 (p<0,001)	4,78
	8	0,741±0,022 (p<0,001)	3,631±0,024 (p<0,001)	4,90
	9	0,745±0,019 (p<0,001)	3,755±0,031 (p<0,001)	5,04
	10	0,751±0,022 (p<0,001)	3,823±0,028 (p<0,001)	5,09
3,0	7	0,754±0,028 (p<0,001)	3,657±0,019 (p<0,001)	4,85
	8	0,761±0,022 (p<0,001)	3,767±0,091 (p<0,001)	4,95
	9	0,755±0,020 (p<0,001)	3,813±0,025 (p<0,001)	5,05
	10	0,732±0,034 (p<0,001)	3,733±0,042 (p<0,001)	5,10
4,0	7	0,891±0,029 (p<0,001)	4,375±0,160 (p<0,005)	4,91
	8	0,746±0,050 (p<0,001)	3,750±0,045 (p<0,001)	5,03
	9	0,721±0,031 (p<0,001)	3,675±0,231 (p<0,005)	5,10
	10	0,775±0,085 (p<0,005)	4,001±0,037 (p<0,001)	5,16
5,0	7	0,775±0,027 (p<0,001)	3,860±0,077 (p<0,005)	4,98
	8	0,750±0,045 (p<0,001)	3,840±0,025 (p<0,001)	5,12
	9	0,760±0,031 (p<0,001)	3,934±0,032 (p<0,005)	5,18
	10	0,745±0,016 (p<0,001)	3,956±0,028 (p<0,001)	5,31

\* значения ИПА были рассчитаны с использованием средних значений концентрации клеток.

применяли сыворотку двух типов обработки: стерильную 1 категории и очищенную с помощью ПЭГ, в соотношении 1:1. Выращивание клеток с 7 по 10 пассажи проводили в питательных ростовых средах с разным содержанием сыворотки: 2,5; 3,0; 4,0; 5,0%. Результаты проведенного анализа представлены в табл. 1, а также на рис.1, 2.

Как следует из табл. 1 и рис. 1, 2, при использовании 5% сыворотки крови КРС ИПА культуры клеток ВНК-21/2-17 на протяжении 7–10 пассажей увеличивался с 4,98 до 5,31. Применение 4% сыворотки крови в составе питательной ростовой среды приводило к росту значений ИПА с 4,91 по 5,16, что на 1–2% ниже по сравнению с использованием 5% сыворотки.

Суспензионное выращивание данной клеточной линии в среде с содержанием 3% сыворотки крови КРС в течение 7–10 пассажей давало возможность увеличивать пролиферативный потенциал клеток с 4,85 по 5,10, что на 2–3% ниже по сравнению с применением 5% сыворотки. Также оценивали влияние 2,5% сыворотки на пролиферативную активность клеток, которая на протяжении 7–10 пассажей увеличивалась с 4,78 по 5,09 и была ниже на 3–4% по сравнению с использованием 5% сыворотки.

Таким образом, увеличение массовой доли сыворотки крови КРС от 2,5 до 5,0% в составе питательной ростовой среды приводило к увеличению пролифера-

Таблица 2  
Концентрация иммуногенных компонентов вируса ящура при его репродукции в клетках линии ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС (n=9)

Штамм вируса ящура	Название иммуногенных компонентов	Концентрация иммуногенных компонентов (мкг/мл) при			
		2,5%	3,0%	4,0%	5,0%
«О/Саудовская Аравия/08»	146S	1,400±0,078 (p<0,005)	1,470±0,099 (p<0,005)	1,320±0,079 (p<0,005)	1,370±0,140 (p<0,005)
	146S+75S	1,810±0,095 (p<0,005)	2,110±0,130 (p<0,005)	1,800±0,110 (p<0,005)	1,950±0,160 (p<0,001)
«А/Турция/06»	146S	1,700±0,085 (p<0,001)	1,450±0,095 (p<0,001)	1,210±0,055 (p<0,001)	1,800±0,090 (p<0,001)
	146S+75S	3,000±0,120 (p<0,001)	2,300±0,100 (p<0,001)	1,770±0,055 (p<0,005)	2,750±0,105 (p<0,001)
«А-Кути»	146S	2,180±0,100 (p<0,005)	1,890±0,038 (p<0,001)	1,640±0,085 (p<0,001)	2,500±0,085 (p<0,005)
	146S+75S	2,720±0,120 (p<0,005)	2,650±0,105 (p<0,001)	2,800±0,090 (p<0,005)	3,550±0,140 (p<0,001)
«Asia-1/Shamir/3-89»	146S	1,590±0,090 (p<0,001)	1,550±0,105 (p<0,001)	1,420±0,110 (p<0,001)	1,500±0,161 (p<0,001)
	146S+75S	2,100±0,100 (p<0,001)	2,120±0,120 (p<0,001)	1,850±0,150 (p<0,005)	1,950±0,080 (p<0,001)

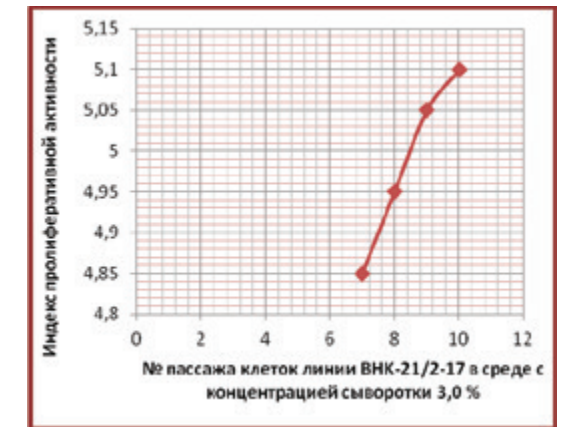
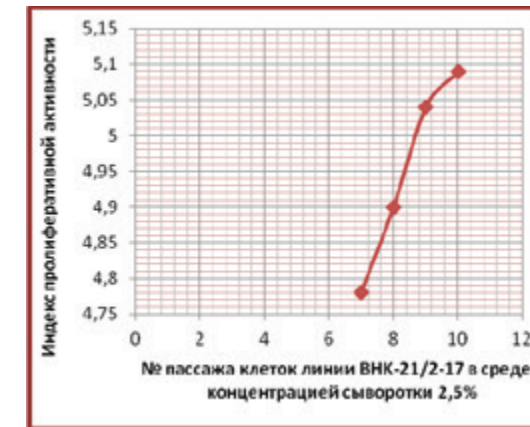
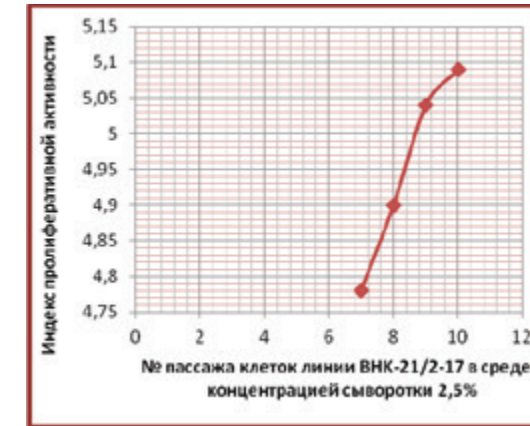


Рис. 1. Графики роста индекса пролиферативной активности клеток линии ВНК-21/2-17 с 7 по 10 пассажи при разном содержании сыворотки крови КРС: 5% (А), 4% (Б), 3% (В), 2,5% (Г) (n=9)

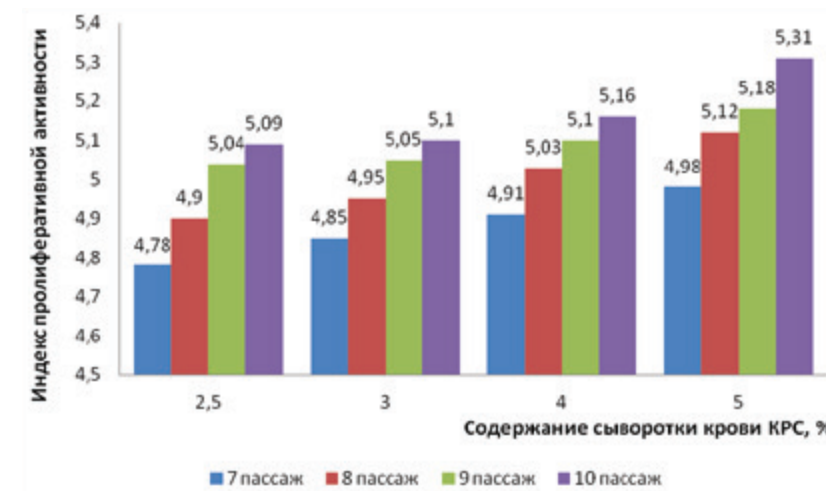


Рис. 2. Влияние концентрации сыворотки крови КРС в составе ростовой среды на индекс пролиферативной активности клеток линии ВНК-21/2-17 с 7 по 10 пассажи (n=9)

тивной активности клеток линии ВНК-21/2-17 на 3–4% в течение 7–10 пассажей. При этом в течение данных пассажей при фиксированном значении содержания сыворотки крови КРС также наблюдался незначительный рост пролиферативного потенциала клеток.

На следующем этапе работы суспензионную культуру клеток ВНК-21/2-17 ((3,0–3,2)×10<sup>6</sup> клеток/мл), выращенную в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС, заражали сле-

дующими штаммами культурального вируса ящура: «О/Саудовская Аравия/08», «А/Турция/06», «А-Кути», «Asia-1/Shamir/3/89». После культивирования и очистки антигена вируса определяли концентрацию его иммуногенных компонентов в РСК. Полученные данные отражены в табл. 2 и на рис. 3.

Как следует из табл. 2 и рис. 3, концентрации иммуногенных компонентов (146S+75S) штамма культурального вируса ящура «О/Саудовская Аравия/08» в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17, выращенных в питательной ростовой среде с концентрациями сыворотки крови КРС: 2,5; 3,0; 4,0; 5,0%,

составляли 1,81; 2,11; 1,80; 1,95 мкг/мл соответственно. Используя клетки, выращенные в тех же условиях, проводили их заражение штаммом культурального вируса ящура «А/Турция/06», в результате этого концентрации 146S+75S-компонентов составили: 3,00; 2,30; 1,77; 2,75 мкг/мл. Культивируя штамм вируса ящура «А-Кути» в клетках, выращенных с применением 2,5; 3,0; 4,0; 5,0% сыворотки крови КРС, получили иммуногенные компоненты с концентрациями: 2,72; 2,65;

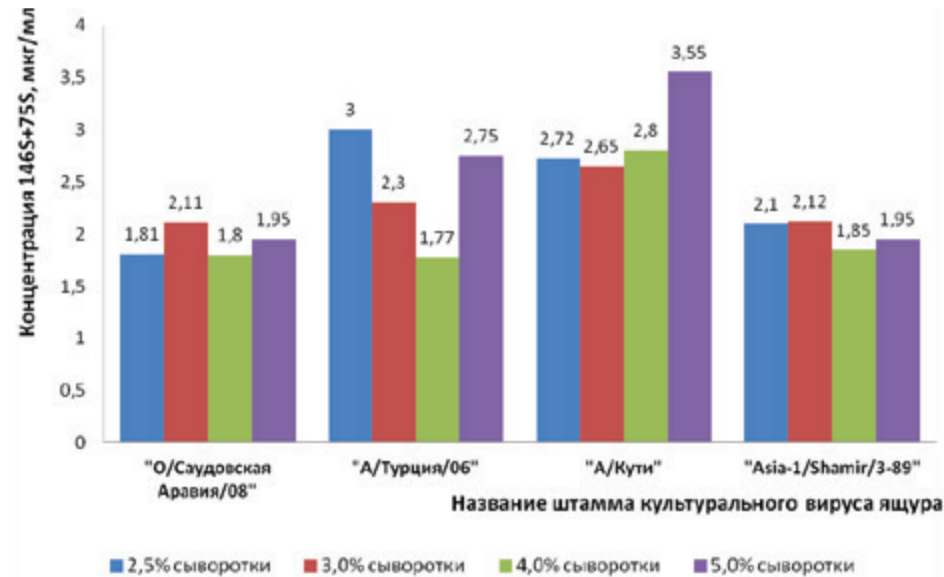


Рис. 3. Накопление 146S+75S иммуногенных компонентов культурального вируса ящура разных штаммов в клетках линии ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС (n=9)

2,80; 3,55 мкг/мл. Концентрации 146S+75S-компонентов штамма вируса ящура «Asia-1/Shamir/3-89», полученных в аналогичных условиях, составляли 2,10; 2,12; 1,85; 1,95 мкг/мл. Иными словами, наибольшее накопление иммуногенных компонентов штамма вируса ящура «О/Саудовская Аравия/08» наблюдалось при заражении клеток, выращенных в среде с 3,0% сыворотки, штамма «А/Турция/06» — с 2,5%, штамма «А-Кути» — с 5,0%, «Asia-1/Shamir/3-89» — с 2,5%.

Таким образом, из анализа полученных результатов следует, что изменение массовой доли сыворотки крови КРС от 2,5 до 5,0% в составе питательной среды, предназначенной для роста и развития клеток линии ВНК-21/2-17, не оказывает влияния на концентрацию иммуногенных компонентов культурального вируса ящура.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка влияния на репродукцию суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 и культурального антигена вируса ящура сыворотки крови КРС разной концентрации стерильной и очищенной с помощью ПЭГ в соотношении 1:1 в составе питательной среды.

Выявлено, что увеличение содержания сыворотки крови КРС с 2,5 до 5,0% вызывало незначительный (на 3–4%) рост индекса пролиферативной активности клеток. На протяжении 7–10 пассажей при фиксированном значении содержания сыворотки крови КРС также наблюдалось небольшое (на 5–6%) увеличение пролиферативного потенциала клеток.

Определено, что содержание разного количества сыворотки крови КРС в питательной ростовой среде, предназначенной для выращивания клеток линии ВНК-21/2-17, не оказывало существенного влияния на репродукцию вируса ящура и выход его иммуногенных компонентов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. — М.: Мир, 1983. — 263 с.
2. Бондаренко А.Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. — Суздаль, 1994. — 92 с.
3. Влияние полиэтиленгликоля на пролиферативную активность клеток ВНК-21/2-17 / Д.В. Михалишин,

М.Н. Гусева, Е.В. Белик, В.В. Михалишин // Ветеринария и кормление. — 2010. — № 6. — С. 28–29.

4. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.

5. Дроздова Т.И. Стандартизация сыворотки крови и амниотической жидкости крупного рогатого скота, используемой в вирусологии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1980. — 14 с.

6. Использование очищенной от антител сыворотки крови крупного рогатого скота для промышленного культивирования суспензионных клеток ВНК-21 и вируса ящура / М.В. Котова, А.Н. Бурдов, В.В. Прохоров [и др.] // Ящур (К новой стратегии борьбы с ящуром): матер. Междунар. конф. — Владимир, 1992. — Ч. 2. — С. 24–31.

7. Культура животных клеток. Методы / под ред. Р. Фрешни. — М.: Мир. — 1989. — 333 с.

8. Малахов А.Г., Винокурова Т.К. Биохимический полиморфизм белков и ферментов и его использование в диагностике заболеваний и селекции сельскохозяйственных животных // Сб. науч. трудов Московской ветеринарной академии. — 1973. — Т. 70. — С. 5–8.

9. Особенности парвовирусной инфекции КРС / В.А. Мищенко, А.А. Гусев, В.М. Захаров [и др.] // Ветеринария. — 2000. — № 5. — С. 19–21.

10. Особенности проявления вирусных и ассоциативных вирусно-бактериальных болезней КРС / А.Г. Глотов, Н.А. Шкиль, Т.Н. Глотова [и др.] // Ветеринария с.-х. животных. — 2006. — № 8. — С. 15–24.

11. Особенности респираторных инфекций телят / В.А. Мищенко, А.А. Гусев, Н.А. Яременко [и др.] // Ветеринария. — 2000. — № 9. — С. 5–6.

12. Barteling S.J. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing ВНК-suspended cell cultures // Bull. OIE. — 1974. — Vol. 81, № 11–12. — P. 1243–1254.

13. Mesquita J.A., Carneiro A.S. Foot-and-mouth disease vaccine with antigens produced in cell cultures grown with PEG-treated bovine serum // Bol. CPFA. — 1979. — № 33–34. — P. 62.

14. Mesquita J.A., Vieira A. Polyethyleneglycol-treated bovine serum for use in cell cultures // Bol. CPFA. — 1979. — № 35–36. — P. 64.

УДК 619:616.98:578.835.2:615.371:515-078

## ИЗУЧЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЭМУЛЬСИОННЫМИ ПРОТИВОЯЩУРННЫМИ ВАКЦИНАМИ

С.Р. Кременчугская<sup>1</sup>, Н.Н. Луговская<sup>2</sup>, Т.К. Майорова<sup>3</sup>, А.С. Шарыпов<sup>4</sup>

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

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

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

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

### РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения гуморального иммунитета у крупного рогатого скота после однократной иммунизации инактивированными эмульсионными противоящурными вакцинами на основе адъювантов Montanide ISA 70 и ISA 206 с использованием реакции нейтрализации и иммуноферментного анализа. Показано, что вакцины индуцируют выработку высокого уровня антител, который сохранялся в течение 70 суток после вакцинации (срок наблюдения).

Ключевые слова: противоящурные вакцины, адъюванты Montanide ISA, уровень антител, реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ.

UDC 619:616.98:578.835.2:615.371:515-078

## STUDY OF HUMORAL IMMUNITY IN ANIMALS IMMUNIZED WITH EMULSION FMD VACCINES

S.R. Kremenchugskaya<sup>1</sup>, N.N. Lugovskaya<sup>2</sup>, T.K. Mayorova<sup>3</sup>, A.S. Sharypov<sup>4</sup>

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

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

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

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

### SUMMARY

The paper demonstrates results obtained during the study of humoral immunity in cattle after single immunization with inactivated emulsion FMD vaccines based on Montanide ISA 70 and ISA 206 adjuvants. The humoral immunity was assessed using virus neutralization test and ELISA. The vaccines were demonstrated to induce high level of antibodies maintained for 70 days post vaccination (observation period).

Key words: Mannheimia haemolytica, enzyme-linked immunosorbent assay, lipopolysaccharide antigen, cattle.

### ВВЕДЕНИЕ

Для профилактики ящура необходимо применять вакцины, обуславливающие формирование быстрого и продолжительного иммунитета после однократной иммунизации. Однако не всегда используемые для профилактических целей препараты отвечают этим требованиям, поэтому для обеспечения защиты от заболевания в течение длительного времени осуществляется регулярная ревакцинация животных.

В последние годы многие исследователи проводили оценку гуморального иммунитета по титрам антител в сыворотке крови животных в серологических реакциях после иммунизации противоящурными вакцинами на основе различных адъювантов. Было установлено, что эмульсионные вакцины на основе адъювантов Montanide индуцируют более выраженный и продолжительный иммунный ответ у крупного рогатого скота и овец, что свидетельствовало о возможности замены ими коммерческих сорбированных препаратов для профилактической иммунизации животных [3–5].

Целью исследований являлось изучение гуморального иммунитета у животных, экспериментально иммунизированных эмульсионными вакцинами производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», с использованием микрометода реакции нейтрализации и иммуноферментного анализа.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вакцины и вакцинация животных.** Для иммунизации животных применяли культуральные инактивированные моновалентные эмульсионные вакцины с типами эмульсий вода–масло и вода–масло–вода на основе адъювантов Montanide ISA 70 и Montanide ISA 206 из штамма вируса ящура типа А, относящегося к генетической линии Юго-Восточная Азия-97 (SEA-97) топотипа Азия.

Для испытания эмульсионных вакцин были использованы 2 группы по 17 голов взрослого крупного рогатого скота (КРС) массой 250–300 кг из хозяйств, где не проводится профилактическая вакцинация против

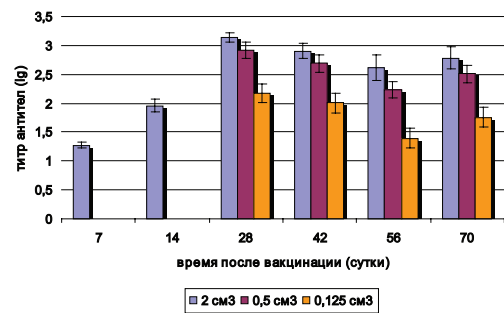


Рис. 1. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в РМН у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 70 в разных дозах

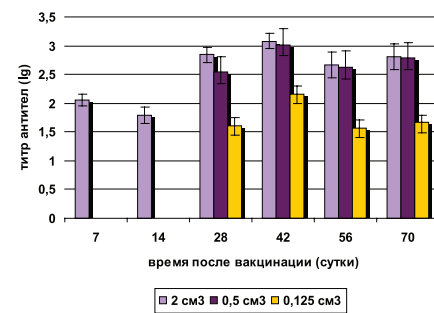


Рис. 2. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в ИФА у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 70 в разных дозах

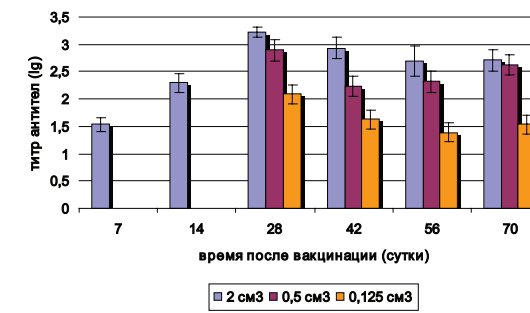


Рис. 3. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в РМН у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 206 в разных дозах

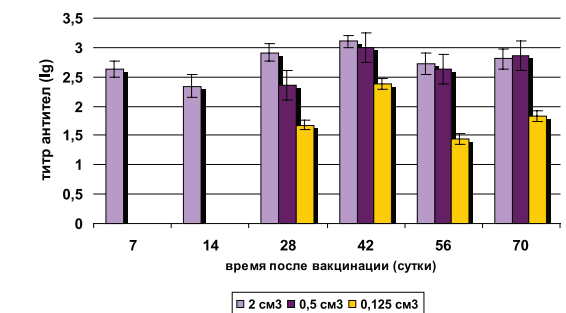


Рис. 4. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в ИФА у КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 206 в разных дозах

ящура. Каждой подгруппе из 5 животных вводили вакцину в прививных объемах 2,0, 0,5 и 0,125 см<sup>3</sup>. Контролем служили по 2 невакцинированных животных.

Для сравнительного изучения эффективности вакцин животным третьей группы однократно вводили сорбированную (адьювант — гидроокись алюминия с сапонином) инактивированную моновалентную вакцину из того же штамма вируса ящура типа А в прививном объеме 2,0 см<sup>3</sup>.

**Сбор образцов.** От КРС отбирали пробы крови до вакцинации и через 7, 14, 28, 42, 56, 70 суток после вакцинации.

Полученные образцы сыворотки крови до использования хранили при температуре минус 20 °С.

**Серологические исследования.** Титры вируснейтрализующих антител в образцах сыворотки крови КРС определяли в реакции микронейтрализации (РМН) в 96-луночных культуральных планшетах против 100 ТЦД<sub>50</sub> вируса ящура типа А, гомологичного вакцинному штамму. Титром антител считали конечное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД<sub>50</sub> гомологичного вируса в 50% лунок.

Для исследования сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью жидкофазного блокирующего непрямого сэндвич-варианта использовали набор для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в ИФА согласно инструкции по его применению, утвержденной ФГБУ «ВНИИЗЖ». В состав набора входили вирусоспецифические компоненты, полученные на штамм вируса ящура А №2187/Кути/2013. За титр антител принимали величину, обратную конечному разведению сыворотки, в котором наблюдался процент ингибирования (PI) не менее 50%.

Титры антител в РМН и ИФА выражали в десятичных логарифмах (lg). Положительными считали пробы от животных с титром антител в сыворотке крови 1,68 lg и выше.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании образцов сыворотки крови, отобранных до начала вакцинации, установлено, что титры антител были ниже 1,2 lg.

Результаты исследований сыворотки крови животных в РМН и ИФА через 7, 14, 28, 56 и 70 суток после иммунизации животных эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 70 представлены на рис. 1 и 2.

Как видно из рис. 1 и 2, к 7 суткам после иммунизации КРС образование вируснейтрализующих антител в РМН и ИФА было отмечено у всех животных, привитых

эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 70 в прививном объеме 2,0 см<sup>3</sup>. Средние титры антител в сыворотке крови в этой группе КРС составляли 1,27±0,05 и 2,06±0,11 lg в РМН и ИФА соответственно. Возрастание титров антител отмечали в РМН с 7 по 28–42 сутки после вакцинации (p<0,05), при этом их максимальные значения составляли 3,15±0,08–2,9±0,13 lg. В ИФА титры антител на 7 и 14 сутки после иммунизации КРС не имели значимых различий (p>0,05), а затем статистически достоверно возрастали и достигали наиболее высоких значений 2,84±0,13–3,08±0,13 lg на 28–42 сутки после введения вакцины. С 42 по 70 сутки после вакцинации (срок наблюдения) титры антител в РМН и ИФА статистически значимых различий не имели (p>0,05) и на 70 сутки составляли в РМН 2,78±0,18 lg и в ИФА — 2,81±0,22 lg.

У КРС, иммунизированного в прививных объемах 0,5 и 0,125 см<sup>3</sup>, средние титры антител в РМН с 28 по 70 сутки после вакцинации статистически значимо не различались и составляли 2,92±0,12–2,51±0,15 и 2,17±0,19–1,75±0,09 lg. При исследовании сыворотки крови этих групп животных в ИФА наблюдали возрастание титров антител между 28 и 42 сутками после вакцинации с 2,54±0,21 до 3,01±0,16 lg и с 1,61±0,08 до 2,16±0,12 lg (p<0,05). Уровень антител в ИФА на 56–70 сутки составлял 2,63±0,27–2,78±0,2 и 1,57±0,14–1,66±0,17 lg для разных доз введенной вакцины соответственно.

Результаты исследований сыворотки крови КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 206 в РМН и ИФА, представлены на рис. 3 и 4.

При изучении иммунного ответа после иммунизации КРС инактивированной вакциной на основе масляного адьюванта Montanide ISA 206 в прививном объеме 2,0 см<sup>3</sup> было установлено, что антитела в РМН и ИФА начинали выявляться в титрах 1,54±0,13 и 2,63±0,14 lg через 7 суток. Максимальный уровень антител в РМН 3,22±0,08 lg и в ИФА lg 3,1±0,1 lg наблюдали через 28 и 42 суток соответственно. К 56–70 суткам после вакцинации уровень антител в РМН и ИФА не изменялся и составлял 2,69±0,28–2,71±0,19 lg и 2,73±0,18–2,81±0,17 lg соответственно.

В группе КРС, иммунизированного эмульсионной вакциной с адьювантом ISA 206 в прививной дозе 0,5 см<sup>3</sup>, средние титры антител на 28 и 42 сутки после вакцинации достигали 2,89±0,1 и 2,99±0,19 lg, а на 70 сутки уровень антител в РМН и ИФА был 2,63±0,2 и 2,85±0,19 lg соответственно.

В группе животных, иммунизированных в дозе 0,125 см<sup>3</sup>, максимальные титры антител в РМН и

ИФА на 28 и 42 сутки после вакцинации составляли 2,09±0,12 и 2,39±0,07 lg и к 70 суткам снижались до 1,63±0,06 и 1,84±0,08 lg.

Как следует из результатов, представленных на рис. 5, в сыворотке крови КРС, однократно иммунизированного инактивированной сорбированной вакциной, титры антител к вирусу ящура типа А в РМН и ИФА были значительно ниже, чем при иммунизации эмульсионными вакцинами. Наиболее высокий уровень антител 1,8±0,36–1,76±0,26 lg в РМН и 2,16±0,16–1,82±0,11 lg в ИФА отмечали на 14–28 сутки после вакцинации, но к 56–70 суткам титры были ниже уровня положительных значений, принятых для используемых реакций. Согласно инструкции по применению инактивированной сорбированной вакцины более продолжительный иммунитет в производственных условиях при иммунизации ранее не вакцинированных против ящура животных достигается двукратным введением препарата с интервалом 10–20 суток.

Ранее было показано, что титры поствакцинальных антител в сыворотке крови КРС 1,5 lg и выше, полученные в жидкофазном блокирующем варианте ИФА с использованием предыдущей версии наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ», свидетельствуют о достаточной защите животных от заражения ящуром [1]. Ученые из исследовательского института IVRI (Индия) с помощью ROC-анализа показали, что минимальным титром в жидкофазном блокирующем варианте ИФА, соответствующим защитному титру в сыворотке крови КРС в реакции нейтрализации 1,8 lg, является титр 2,1 lg, однако авторы подчеркивают, что полученные данные необходимо сравнить с защитным статусом животных *in vivo* [2].

В исследованиях, представленных в данной статье, эмульсионные вакцины с адьювантами Montanide ISA 70 и ISA 206 при применении КРС в дозах 2,0 и 0,5 см<sup>3</sup> индуцировали образование антител, регистрируемых в ИФА и РМН в титрах выше 2,0 lg, начиная с 28 суток после вакцинации на протяжении всего срока наблюдения. Полученные результаты позволяют предположить, что вакцинированные животные будут защищены от заражения вирусом ящура.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, однократное введение КРС инактивированных эмульсионных вакцин из антигена вируса ящура типа А на основе адьювантов Montanide ISA 206 и ISA 70 способствовало выработке антител, регистрируемых в течение всего срока наблюдения (70 суток после вакцинации) в ИФА и РМН в более высоких титрах, чем при иммунизации сорбированной вакциной.

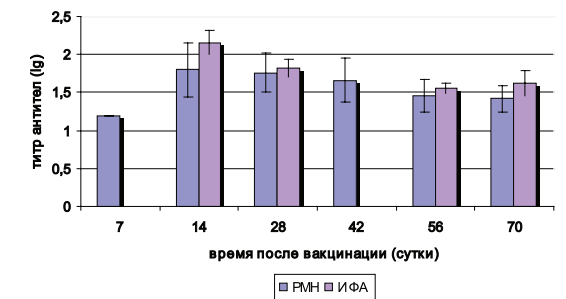


Рис. 5. Динамика титров антител к вирусу ящура типа А в РМН и ИФА у КРС, иммунизированного сорбированной вакциной

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Определение степени защиты крупного рогатого скота от заражения вирусом ящура в зависимости от уровня поствакцинальных антител / А.М. Рахманов, Б.А. Глушко, В.И. Диев [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — 2005. — Т. 3. — С. 144–150.
2. Assessment of the relationship between serum neutralizing antibody titre and liquid phase blocking ELISA titre in immune response to FMDV vaccine / R.P.T. Selvan, B.P. Sreenivasa, M. Hosamani [et al.]. — URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/eufmd/commissions/eufmd-home/fmd-surveillance/situation-reports/en> (дата обращения: 16.05.16).
3. Comparative study for immune efficacy of two different adjuvants bivalent FMD vaccines in sheep / A.M.A. Selim, N.Z. Abouzeid, A.M. Aggour, N.M. Sobhy // J. Am. Sci. — 2010. — Vol. 6, № 10. — P. 1292–1298.
4. Early antibody responses of cattle for foot-and-mouth disease quadrivalent double oil emulsion vaccine / P.K. Patil, J. Bayry, S.P. Nair [et al.] // Vet. Microbiol. — 2002. — Vol. 87. — P. 103–109.
5. Longevity of protection in cattle following immunisation with emergency FMD A22 serotype vaccine from the UK strategic reserve / S.J. Cox, B.V. Carr, S. Parida [et al.] // Vaccine. — 2010. — Vol. 28. — P. 2318–2322.

# ПАРАМИКСОВИРУСНЫЕ ЗООНОЗЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РУКОКРЫЛЫМИ

В.В. Макаров<sup>1</sup>, Д.А. Лозовой<sup>2</sup>, А.А. Стрижаков<sup>3</sup>

<sup>1</sup> доктор биологических наук, профессор, РУДН, г. Москва; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: vvm-39@mail.ru

<sup>2</sup> директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>3</sup> доктор ветеринарных наук, профессор, РУДН, г. Москва

## РЕЗЮМЕ

В статье рассматриваются естественно-исторические аспекты эмерджентности опасных парамиксовирусных инфекций, связанных с рукокрылыми резервуарами, — болезни Хендра, Нипах, Менангле, их происхождение и распространение.

Ключевые слова: *Chiroptera*, вирусы рукокрылых, природная очаговость, болезни Хендра, Нипах, Менангле, хенипавирусная инфекция.

# PARAMYXOVIRAL ZOOSEAS ASSOCIATED WITH CHIROPTERA

V.V. Makarov<sup>1</sup>, D.A. Lozovoy<sup>2</sup>, A.A. Strizhakov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: vvm-39@mail.ru

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

<sup>3</sup> Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

## SUMMARY

The paper describes natural historic aspects of emerging dangerous paramyxoviral infections associated with chiropteran reservoir species – Hedra, Nepah, Menangle viruses, their origin and spread.

Key words: *Chiroptera*, *Chiroptera viruses*, natural nidality, *Hendra virus*, *Nepah virus*, *Menangle virus*, *henipavirus infection*.

В предыдущих публикациях рассмотрены избранные аспекты биологии и экологии рукокрылых, имеющие важное значение в ветеринарной и гуманной эпидемиологии и актуальные в контексте эмерджентности ассоциированных с ними инфекций, связанные с рукокрылыми хенипа- и коронавирусами, важнейшие элементы эпидемиологии коронавирусных «bat-born» зоонозов — тяжелого острого и ближневосточного респираторных синдромов [2–4]. В настоящем сообщении аналогичным образом проанализированы ассоциированные с рукокрылыми резервуарами парамиксовирусные болезни Хендра, Нипах, Менангле, хенипавирусная инфекция, их эмерджентное происхождение и распространение.

## БОЛЕЗнь ХЕНДРА

В 1994 г. в Хендра (Hendra), пригороде Брисбена, Австралия, возникла эпидемическая вспышка острого респираторного заболевания у 21 лошади и 2 людей-хендлеров (тренер и конюх), закончившаяся леталь-

но для 13 лошадей и одного человека. В возникших впоследствии четырех вспышках (1994, 1999, 2004) были инфицированы еще 5 лошадей и двое людей, с летальным исходом за исключением только одного человека. Все случаи заболевания людей произошли в результате прямого контакта с больными лошадьми. Инцидентность заболевания лошадей продолжается в течение последующих лет [5, 11, 13, 25].

Столь серьезный и необычный эпидемиологический прецедент, исторически один из первых примеров истинной эмерджентности высоколетабельных инфекций, получивший широкий общественный резонанс и сопровождавшийся разнообразными спекуляциями вплоть до неудачных «экспериментов» с биологическим оружием, потребовал срочных мероприятий по установлению его источника.

Естественным хозяином и наиболее реальным резервуаром вируса Хендра (HeV) оказалась группа фруктоядных рукокрылых *Pteropus spp.* (летучих лисиц), у которых был установлен высокий уровень

серопревалентности, что указывало на возможность их участия в возникновении заболевания в качестве природного источника. При обследовании 800 лошадей и домашних животных прочих видов, имевших различные контакты и экспонированных в инцидентах (крупный рогатый скот, козы, свиньи, собаки, кошки, цыплята), каких-либо серологических и иных признаков инфекции не обнаружено. Дальнейшие обследования окончательно подтвердили отсутствие эпидемической роли наземных животных, кроме лошадей, в качестве восприимчивых, резервуаров или источников [9, 11].

Серопозитивность продемонстрирована у всех четырех австралийских представителей рода *Pteropus*: баванской (*P. alecto*), восточно-австралийской (*P. poliocephalus*), малой красной (*P. scapulatus*) и новогвинейской (*P. conspicillatus*) летучих лисиц, во всех географических зонах, в том числе ретроспективно с использованием архивных образцов сывороток крови. Окончательно установлено, что HeV присутствует во всех популяциях летучих лисиц в Австралии и Папуа — Новой Гвинее. Дополнительно к этому экспериментально показано, что у летучих лисиц после заражения HeV развивается субклиническая инфекция с краткосрочной вирусемией [11, 13].

О естественной инфекции Хендра среди летучих лисиц и о путях циркуляции среди них вируса мало что было известно. Тем не менее, предложены три альтернативные модели, универсально приемлемые в подобных эмерджентных ситуациях [11]:

- инфекция является полигостальной энзоотией и поддерживается одновременно среди животных всех восприимчивых видов (включая наземных), т.е. вспышка возникла без участия внешнего источника и была индигенной для лошадей;
- инфекция является периодической эпизоотией со смешанной, непостоянной пространственной или временной персистенцией в межэпизоотических периодах среди восприимчивых животных разных видов (как рукокрылых, так и наземных);
- инфекция является моногостальной энзоотией у животных только определенного вида, но полипатогенной, с периодическим вовлечением других видов и возникновением эпизоотических вспышек.

Паттерн эпизоотической передачи инфекции от летучих лисиц к лошадям согласно гипотезе последнего типа фактологически лучше других соответствует общим принципам функционирования паразитарных систем и доктрине саморегуляции последних В.Д. Белякова (1983) [1].

При продолжительной сбалансированной резервации HeV в популяции летучих лисиц с субклиническим течением инфекции в определенной местности и в течение конкретного времени непредсказуемо возникают естественные факторы, нарушающие или регулирующие баланс, способствующие тем самым повышению локальной вероятности распространения вируса на лошадей. Этими факторами эпизоотического риска могут быть различные стереотипные стрессовые эффекты внутри- и внепаразитосистемного порядка как

на индивидуальном, так и популяционном уровнях. Наиболее реальные из них:

- прежде всего, это исходная интродукция HeV в интактные локальные популяции летучих лисиц из других источников (за счет метапопуляционных, межвидовых контактов или абиотических факторов передачи, таких как объекты кормления и убежища);
- сезонные изменения физиологического статуса (например, периоды размножения);
- сезонные миграции, кочевки и иные перемещения в поисках корма;
- истощение среды обитания, вынуждающее рукокрылых, зависимых от растительного мира, перемещаться в антропогенные условия за счет провоцирующей деятельности человека;
- непредвиденное увеличение популяционной плотности (при благоприятных условиях), преодоление пороговых лимитов восприимчивости в локальных популяциях, обычно приводящие в действие экосистемные ограничивающие механизмы, прежде всего нарушение взаимной паразитохозяинной толерантности и обострения асимптоматического течения инфекций вплоть до эпизоотических вспышек среди летучих лисиц, повышающие концентрацию инфекционного начала в пространстве<sup>1</sup>.

Согласно моделям динамики распространения, в естественных условиях предполагается, что болезнь Хендра не является персистентной в локальных популяциях, но сохраняется на значительном пространстве из-за метапопуляционного разброса и таких механизмов, как межпопуляционный трафик, заносы, обмена возбудителями и т.п. [11, 13]; в этом находит объяснение низкая частота встречаемости положительных находок и низкие уровни серо- и ПЦР-позитивности среди летучих лисиц.

Внутрипопуляционное горизонтальное перезаражение среди колониальных рукокрылых обуславливается тесным контактом через различные выделения (выдыхаемый воздух, слюну, мочу, помет), чему во многом способствуют невероятно высокая плотность их населения на единицу площади убежищ и насестов и в целом биотопические особенности поведения [2].

Заражение лошадей осуществляется, вероятно, воздушно-пылевым путем в результате прямых контактов с увеличивающимся по каким-то причинам числом зараженных рукокрылых (увеличением плотности источника инфекции) или объектами среды, контаминированными различными отходами, включая родовые, по цепи «скрыто инфицированные летучие лисицы → лошади» (и далее люди).

Все случаи заражения людей имели лица, бывшие в тесном контакте с больными животными или выполнявшие вскрытие павших лошадей.

Болезнь Хендра в клинико-эпизоотологическом стереотипе представляет тяжелый фатальный зооноз с поражением лошадей и людей, имеет тупиковый характер spill over<sup>2</sup>, от больных лошадей здоровым горизонтально не передается. Наиболее важными с точки зрения эпизоотической цепи «летучие лисицы → лошади» являются факторы, провоцирующие их сопряженно

<sup>1</sup>Случаи последнего типа хорошо известны для ряда эпидемических ситуаций. В частности, на модели природно-очагового бешенства в США показана сильная связь между временной динамикой эпизоотий у резервуарных хозяев и заболеваемостью типа spill over у домашних животных [24].

<sup>2</sup>Spill over (англ. буквально «избыток, переливание через край») — в контексте темы случайная, тупиковая заболеваемость животных, которые не обеспечивают естественную циркуляцию инфекции. Определение, принятое в современной эпидемиологии.

локализованные контакты. Во всех описанных инцидентах отмечено повышение активности рукокрылых и их количественное скопление в местах содержания лошадей, предшествующее их заболеваемости. Этому очевидно благоприятствовало территориальное совмещение рощ фруктовых деревьев, привлекающих фруктоядных рукокрылых, и пастбищ лошадей, что служит одним из первичных факторов эпизоотологического риска. Большинство инцидентов совпадало с родовым сезоном летучих лисиц — периодом беременности и ранней лактации, когда беременные и кормящие самки подвержены более высокому риску заражения HeV (август–октябрь), что тем самым, биологически и экологически, обуславливало сезонную зависимость заболеваемости во внутригодичной динамике [5, 11, 13].

В 14 зарегистрированных спорадических инцидентах с заболеванием 48 лошадей летальность составила 75%. Из семи заболевших людей погибли трое (43%).

*Клинические признаки у лошадей* в целом непатогномичны и включают инкубационный период от 5 до 16 дней (при экспериментальной инфекции), лихорадку, опухание связок, тяжелый респираторный дистресс, атаксию, терминальные назальные истечения — обильные пенные, нередко с примесью крови; типично быстрое наступление смерти через два дня с начала клинического проявления. У нелетально переболевших в половине случаев отмечены признаки нейрологических поражений средней тяжести.

В клиническом периоде болезни вирус прогрессивно распространяется по всем тканям и жидкостям организма, вызывает повреждение эндотелия сосудов и васкулиты; именно этим патогенетическим механизмом обусловлены экстенсивные клинические проявления в зависимости от локализации вирусиндуцированных поражений в той или иной органной системе. Вирус выделяется с назальными истечениями за 4–5 дней до появления лихорадочной реакции и других видимых признаков заболевания, т.е. внешне здоровое животное становится потенциально заразным, активным источником инфекции (в частности, для людей, работающих с лошадьми). В условиях экспериментальной инфекции HeV обнаруживается в крови, широком спектре тканей организма, выделяется с респираторными и назальными секретами, в слюне и моче.

У людей болезнь Хендра возникает с недельным инкубационным периодом после рабочих контактов с больными лошадьми или патологическим материалом, протекает в форме тяжелого гриппоподобного дистресс-синдрома со смертью вследствие респираторных и почечных поражений [6].

### БОЛЕЗНЬ НИПАХ

В период с сентября 1998 по апрель 1999 г. вновь возникла эмерджентная эпидемия зоонозного характера, ассоциированная с рукокрылыми, на этот раз в полуостровной части Малайзии, сопровождавшаяся заболеванием и смертностью среди свиней и людей, заражением лошадей, собак и кошек. Причиной стал также новый, таксономически близкий HeV, парамиксовирус **Нипах** (Nipah, NiV) (впоследствии оба вируса составили новый род семейства *Paramyxoviridae* — *Henipavirus*). Ретроспективно установлено, что спорадические случаи новой инфекции у свиней обнаруживались еще двумя годами ранее (1996), но остались без должного внимания [19, 20].

Распространение этой новой, не известной ранее науке вирусной инфекции в Малайзии вызвало серьезное расстройство промышленного свиноводства и сопровождалось массовой и небезосновательной общественной паникой. В рамках политики стемпинг аут и депопуляции было ликвидировано свыше миллиона свиней — до 45% поголовья в стране.

На основании сходства эколого-эпидемиологического паттерна новой инфекции с болезнью Хендра и генетического родства NiV и HeV ее естественным резервуаром и источником, так же как и болезни Хендра, могли быть прежде всего те же фруктоядные рукокрылые — летучие лисицы рода *Pteropus* spp., обитающие в регионе Австралии, Филиппин, Индонезии, Малайзии и некоторых островов Тихого океана, в популяциях которых такие вирусы скрыто сохраняются десятилетиями, если не сотни лет и более. В Малайзии антитела к NiV были обнаружены у рукокрылых пяти из 14 местных видов: серопозитивность высокого уровня установлена у большой (*P. vampyrus*) и малой (*P. hypomelanus*) летучих лисиц, малайского коротконосого (*Cynopterus brachyotis*) и пещерного (*Eonycteris spelaea*) крыланов, а также у одного вида летучих мышей — азиатского домового гладконоса (*Scotophilus kuhli*). В дальнейшем присутствие антител к NiV установлено у летучих лисиц в Камбодже, Таиланде, Китае и Бангладеш. NiV был выделен в серопозитивных колониях больших и малых летучих лисиц [19, 23].

Первичная вспышка болезни Нипах у свиней была вызвана трафиком инфекции непосредственно от фруктоядных рукокрылых к свиньям. Наиболее вероятно, что при определенном стечении факторов риска (см. болезнь Хендра) в корм свиньям, содержащимся в агроценозах вне закрытых помещений, попали контаминированные фрукты и остатки пищи от летучих лисиц или инфицированные трупы последних с дальнейшим алиментарным заражением свиней и распространением от свиньи к свинье по цепи типа «скрыто инфицированные летучие лисицы → контаминированные объекты → свиньи → свиньи...».

Реальные причины эмерджентности болезни Нипах оказались достаточно характерными. Ключевым моментом послужил целый комплекс факторов активной производственной человеческой деятельности и природы, в частности, антропогенные вмешательства и изменения в экологической среде: массовая дефорестация в Юго-Восточной Азии, засухи вследствие ураганов в 1997 и 1998 гг., интенсификация свиноводства в национальном масштабе. Из-за истощения естественной лесной среды обитания популяции фруктоядных рукокрылых переместились в сельскохозяйственные ареалы, где хронологически совпавшее с этим увеличение свиноголовья (популяционной плотности восприимчивых животных) обусловило близкий контакт и «успешный» трафик инфекции от рукокрылых свиньям и далее — человеку.

Болезнь Нипах (согласно Списку МЭБ «вирусный энцефалит Нипах») на свинофермах протекала в виде тяжелого высоколетального *респираторного и/или нейрологического синдрома* (таким было первичное официальное название болезни) с низкой клинической преваляцией и преобладанием асимптоматических форм. При летальности, составившей 40%, смертность в пораженных группах свиней была относительно низкой (менее 5%).

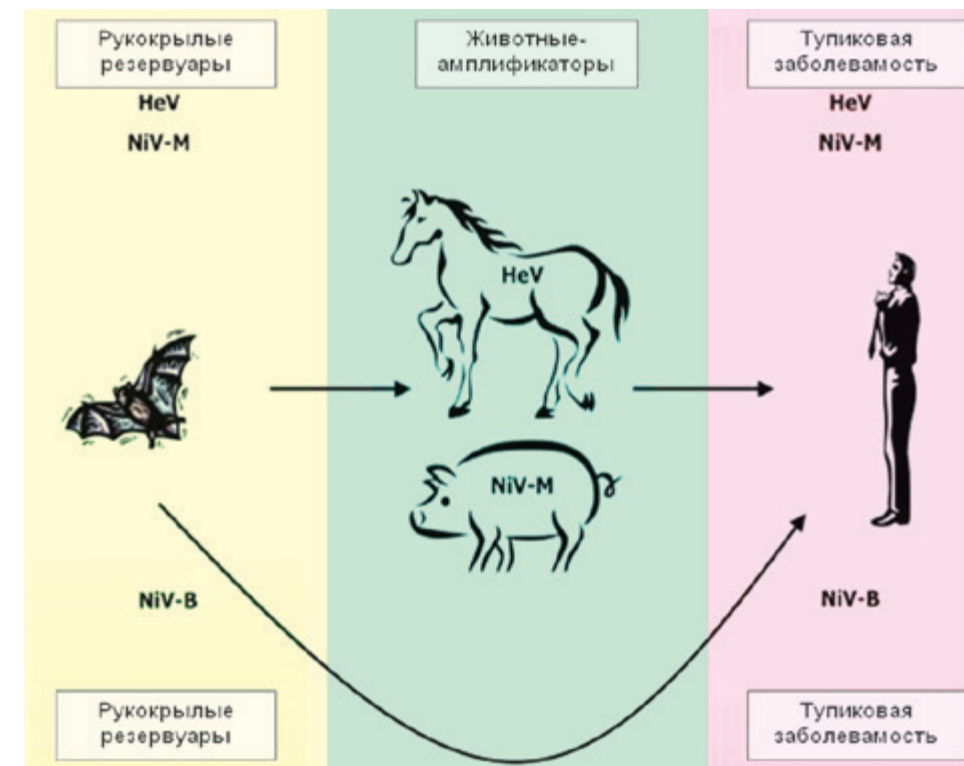


Рис. Эпидемические цепи хенипавирусов [WHO, 2008]

NiV-M и NiV-B обозначают возбудителей болезни Нипах соответственно в Малайзии и Бангладеш.

Инкубационный период заболевания — от 7 до 14 дней. Клинические признаки варьировали в зависимости от возраста. Для свиноматок были характерны симптомы нейрологических поражений, иногда с внезапной смертью свиноматок и хряков. У отъемышей и подсосунков преобладали респираторные расстройства, сопровождающиеся грубым непродуктивным громким лающим кашлем [отсюда местное название болезни «синдром лающей свиньи» (barking pig syndrome)]. Неявные респираторные и нейрологические аномалии у подсосных поросят были указанием на их пораженность.

Болезнь оказалась высококонтагиозной среди свиней. Поражая респираторный тракт свиней, вирус передавался аэрогенным путем с кашлем. Распространение инфекции на благополучные фермы было эпизоотологически очевидным за счет перемещения свиней [20].

У собак в эндемичных зонах обнаруживалась высокая преваляемость инфекции Нипах в ходе развития заболеваемости свиней и непосредственно вслед за ликвидацией неблагополучных очагов, снижающаяся по мере территориального удаления от них. Это указывает, что заражение собак происходило от свиней и среди собак не было горизонтальной передачи, т.е. инфекция имела характер spill over. Риск натурального заражения кошек прямо от рукокрылых также крайне низкий [25].

### ХЕНИПАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Крупная эмерджентная эпидемия зоонозной инфекции Нипах среди свиней 1998–1999 гг. явилась предшественником и амплификатором безусловно ассоциированного с ней эпидемического развития заболеваемости людей. В течение 1999 г. в Малайзии,

вслед за эпизоотией среди свиней, возникли сотни случаев заболевания людей с клиникой гриппоподобного синдрома и энцефалита, более 100 погибли (летальность ~40%).

Далее, с 2001 г. хенипавирус (ранее вирус Нипах, затем Нипах-подобный вирус) является причиной ежегодных серьезных эпидемических вспышек в Бангладеш и Индии, где зарегистрированы сотни заболеваний с летальностью до 100% (в среднем 72,5%) [12, 14, 18, 22, 25].

Показательно, что ранее в Малайзии среди свиней болезнь Нипах имела типично эпизоотическое распространение внутри стад и территориально между фермами путем эстафетной передачи инфекции по эпизоотическим цепям типа «свиньи → свиньи и т.д.»; это послужило основанием для применения радикальных мер (стемпинг аут и даже депопуляции), успешно завершившегося искоренением болезни в национальном масштабе. Все инциденты с заболеваемостью людей возникали без участия рукокрылых, были обусловлены прямым контактом их с живыми инфицированными свиньями по типу spill over, без эпидемически значимой передачи от больных здоровым; в подавляющем большинстве заболеванию были подвержены взрослые китайцы, интенсивно занимающиеся свиноводством [8, 10].

В противоположность этому, продолжившиеся с 2001 г. вспышки хенипавирусной инфекции среди людей на новой территории по своей сути являются уже типичными индикаторами природной очаговости также типа spill over. Ее резервуаром и источником служат непосредственно рукокрылые, без промежуточного этапа амплификации свиньями, как в Малайзии. Заражение людей происходит за счет непрямого контакта по типу алиментарной инфекции при массовом потреблении в качестве источника пищи весьма



популярных у местного населения плодов и сока финиковой пальмы (преимущественно), которыми также кормятся фруктоядные рукокрылые (в том числе спонтанно инфицированные), контаминированных выделениями последних, с возможной дальнейшей непостоянной вторичной передачей от человека к человеку при тесном прямом бытовом контакте (например, отношения в семье, медицинском учреждении) по цепи «скрыто инфицированные рукокрылые → контаминированные растительные продукты, употребляемые в пищу, → человек → человек». В Бангладеш хенипавирус обнаружен также у КРС, свиней и цыплят [12, 22].

На рисунке представлена сравнительная схема эпидемических процессов при болезнях Хендра, Нипах и хенипавирусной инфекции: резервуары, амплификаторы и тупиковая заболеваемость типа spill over.

В данном случае природным резервуаром хенипавирусной инфекции в Бангладеш и Индии оказались индийские летучие лисицы (*P. giganteus*) — единственный вид из всех представителей летучих лисиц рода *Pteropus*, распространенных на территории Индийского субконтинента. Результаты систематического серо-эпидемиологического надзора свидетельствуют о высоком уровне серопозитивности (более 50%) и повсеместном распространении NiV в популяциях *P. giganteus* по всему ареалу их обитания [14, 18].

Преобладающими симптомами хенипавирусной инфекции у людей являются респираторные, реже энцефалические расстройства. Клиническая картина включает гриппоподобные признаки: повышение температуры, головную боль, миалгию, рвоту, далее головокружение, сонливость, дезориентацию и другие нейрологические признаки, указывающие на острый энцефалит, иногда переходящие в коматозное состояние. У небольшого числа выздоравливающих людей (15–20% случаев) сохраняются нейрологические дисфункции (непрекращающиеся конвульсии и изменения личности), возможны рецидивы или отложенное развитие энцефалита [8, 10].

Поскольку ареал обитания летучих лисиц *Pteropus* ограничен островами Тихого и Индийского океанов и континентальными областями от восточной части Пакистана через Юго-Восточную Азию до Австралии, именно этот регион считался эндемичным по хенипавирусной инфекции. В настоящее время серопозитивность к NiV с высоким уровнем обнаружена на востоке (Мадагаскар) и западе (Гана) Африканского континента уже не только у представителей рода *Pteropus*, но и других видов крылановых: рыжих летучих лисиц (*P. rufus*), мадагаскарских летучих собак (*Rousettus madagascariensis*), пальмовых крыланов (*Eidolon helvum*) [16]. Новые африканские изоляты хенипавируса имеют некоторые генетические отличия от азиатского NiV на уровне адаптированных к новым хозяевам линий [15].

Важно, что пальмовые крыланы *E. helvum* населяют многие области Африки к югу от Сахары и образуют большие колонии, совершают ежегодные трансконтинентальные миграции вслед за ливневым градиентом на подходящие кормовые территории. Они зачастую гнездятся в городских условиях и в нескольких африканских странах являются повседневным объектом охоты и употребления в пищу людьми как дополнительный источник протеина; все эти обстоятельства относятся к серьезным факторам эпидемиологического риска [26].

## БОЛЕЗНЬ МЕНАНГЛЕ

В 1997 г. во время эпизоотической вспышки заболевания свиней на крупной коммерческой свиноферме близ городка Менангле (Menangle) в Новом Южном Уэльсе, Австралия, сопровождавшегося мертворождением и уродствами развития потомства, был выделен новый вирус, получивший топонимическое название **вирус Менангле** (Menangle virus, MeV), относящийся к роду *Rubulavirus* семейства *Paramyxoviridae* [17, 21]. Большинство свиноматок вынашивали потомство до положенного срока, однако изредка наблюдались полностью мертворожденные пометы и аборт в разные сроки беременности. В абортированных пометах присутствовали мумифицированные, аутолизированные, недавно умершие и живые поросята. Среди тератогенных дефектов часто встречались артрогрипоз (врожденная амиоплазия), брахигнатия (врожденное недоразвитие нижней челюсти) и кифоз. Со стороны внутренних органов — частичное или полное отсутствие головного и спинного мозга у большинства абортированных поросят, в некоторых случаях размягчение и негнойное воспаление головного и спинного мозга, негнойные миокардит и гепатит [17].

Неблагополучная свиноферма в течение 29 лет до инцидента сосуществовала с колонией летучих лисиц — фруктоядных рукокрылых *Pteropus* spp. Нейтрализующие антитела к MeV были обнаружены у отдельных особей восточно-австралийских (*P. poliocephalus*) и малых красных (*P. scapulatus*) летучих лисиц, сезонно живущих в больших смешанных колониях, а также у особей, гнездившихся не далее чем в 200 м от свинофермы. Прочие виды рукокрылых, обследованные в непосредственной близости от зараженной свинофермы, были серонегативными. Хотя попытки изолировать вирус от летучих лисиц были неудачными, в помете, собранном под их насестами недалеко от свинофермы, с помощью иммуноэлектронной микроскопии были обнаружены парамиксовирусоподобные частицы, реагирующие с мечеными антителами от свиноматок-конвалесцентов.

Серопозитивность установлена и у летучих лисиц из других колоний за тысячи километров от вспышки в Менангле. Антитела к MeV были обнаружены у всех четырех их австралийских видов [7].

Серологическое исследование лиц, контактировавших с инфицированными свиньями, показало, что два человека из 250 бывших в тесном контакте с зараженными свиньями, страдавших от гриппоподобного заболевания (лихорадочное состояние и кореподобная сыпь), имели высокий уровень нейтрализующих антител к MeV. Ни один из них не был в прямом контакте с летучими лисицами [21].

От летучих лисиц различных видов (*Pteropus* spp.) во время поисков резервуара инфекции Нипах на о. Тиоман в Малайзии был выделен еще один новый, считавшийся «сиротским», парамиксовирус рукокрылых рода рубулавирусов — **вирус Тиоман** (*Tioman virus*) [27]. Молекулярные и антигенные исследования показали его очень близкое родство с вирусом Менангле, что косвенно подтвердило происхождение последнего от летучих мышей. Нозогенный потенциал вируса Тиоман по отношению к животным и человеку неизвестен, однако недавними исследованиями установлено, что при заражении свиней развивается заболевание средней тяжести, и получены серологические подтверждения заражения людей этим вирусом на о. Тиоман [28].

Авторы выражают признательность студентам ветеринарного отделения Российского университета дружбы народов Анастасии Чернышевой, Ирине Бондаревой, Ирине Поповой, Ольге Петровой за помощь в сборе и подготовке материалов по теме.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляков В.Д. Саморегуляция паразитарных систем и механизм развития эпидемического процесса // Вестник АМН СССР. — 1983. — № 5. — С. 3–9.
2. Макаров В.В., Лозовой Д.А. Ветеринарная биология рукокрылых // Пест менеджмент. — 2015. — № 4. — С. 26–37.
3. Макаров В.В., Лозовой Д.А. Вирусы рукокрылых (хенипа- и коронавирусы) // Ветеринария. — 2016. — № 2. — С. 3–8.
4. Макаров В.В., Лозовой Д.А. Коронавирусные зоонозы, ассоциированные с рукокрылыми // Ветеринария сегодня. — 2016. — № 2. — С. 66–70.
5. A fatal case of Hendra virus infection in a horse in north Queensland: clinical and epidemiological features / H. Field, P. Barratt, R. Hughes [et al.] // Aust. Vet. J. — 2000. — Vol. 78. — P. 279–280.
6. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans / K. Murray, P. Selleck, P. Hooper [et al.] // Science. — 1995. — Vol. 268. — P. 94–97.
7. An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats / A. Philbey, P. Kirkland, A. Ross [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 1998. — № 4. — P. 269–271.
8. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia / K. Goh, T. Tan, N. Chew [et al.] // New Engl. J. Medicine. — 2000. — Vol. 342 (17). — P. 1229–1235.
9. Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats / D. Hayman, R. Suu-Ire, A. Breed [et al.] // PLoS ONE. — 2008. — Vol. 3:e2739.
10. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pigfarmers in Malaysia / K. Chua, K. Goh, K. Wong [et al.] // Lancet. — 1999. — Vol. 354. — P. 1256–1259.
11. Field H. The ecology of Hendra virus and Australian bat lyssavirus: Ph.D. thesis. — The University of Queensland, Brisbane, Australia, 2004. — 209 p.
12. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh / S. Luby, M. Rahman, M. Hossain [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 12. — P. 1888–1894.
13. Hendra virus infection dynamics in Australian fruit bats / H. Field, C. De Jong, D. Melville [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6:e28678.
14. Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India / J. Epstein, V. Prakash, C. Smith [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 14 (8). — P. 1309–1311.

15. Henipavirus RNA in African bats / J. Drexler, V. Corman, F. Gloza-Rausch [et al.] // PLoS ONE. — 2009. — Vol. 4:e6367.

16. Investigation of a second focus of equine morbillivirus infection in coastal Queensland / R. Rogers, I. Douglas, F. Baldock [et al.] // Australian Vet. J. — 1996. — Vol. 74 (3). — P. 243–244.

17. Menangle virus: A new cause of fetal mummification and congenital defects in pigs / A. Morilla, K.-J. Yoon, J. Zimmerman [et al.] // In Trends in Emerging Viral Infections of Swine. — ISP, 2008. — P. 99–103.

18. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh / V. Hsu, M. Hossain, U. Parashar [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 10 (12). — P. 2082–2087.

19. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia / J. Yob, H. Field, A. Rashdi [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 7. — P. 439–441.

20. Nor M., Gan C., Ong B. Nipah virus infection of pigs in Peninsular Malaysia // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2000. — Vol. 19 (1). — P. 160–165.

21. Probable human infection with a newly described virus in the family paramyxoviridae. The NSW Expert Group / K. Chant, R. Chan, M. Smith [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 1998. — № 4. — P. 273–275.

22. Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001–2007 / S. Luby, M. Hossain, E. Gurley [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 15 (8). — P. 1229–1235.

23. Serological evidence of infection with Nipah virus in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia / M. Johara, H. Field, A. Rashdi [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 7(3). — P. 439–441.

24. Temporal dynamics of rabies in a wildlife host and the risk of cross-species transmission / E. Gordon, A. Curns, J. Krebs [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2004. — Vol. 32. — P. 515–524.

25. The natural history of Hendra and Nipah viruses / H. Field, P. Young, J. Yob [et al.] // Microbes Infect. — 2001. — Vol. 3 (4). — P. 307–314.

26. Thomas D. The annual migrations of three species of West African fruit bats (Chiroptera: Pteropodidae) // Can. J. Zool. — 1983. — Vol. 61. — P. 2266–2272.

27. Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia / K. Chua, L. Wang, S. Lam [et al.] // Virology. — 2001. — Vol. 283. — P. 215–229.

28. Tioman virus, a paramyxovirus of bat origin, causes mild disease in pigs and has a predilection for lymphoid tissues / K. Yaiw, J. Bingham, G. Cramer [et al.] // J. Virol. — 2008. — Vol. 82. — P. 565–568.

УДК 619:616.98:616-036.22(47+57)

## АНАЛИЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ОСОБО ОПАСНЫМ И ЭКОНОМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМ БОЛЕЗНЯМ ЖИВОТНЫХ В ГОСУДАРСТВАХ — УЧАСТНИКАХ СНГ (2013–2015 ГГ.)<sup>1</sup>

Д.А. Лозовой

директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир,  
e-mail: lozovoy@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

На основании представленных руководителями ветеринарных служб государств — участников СНГ в Исполком СНГ материалов, данных МЭБ, дополненных сведениями информационно-аналитического центра Россельхознадзора, и сообщений на заседаниях Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ в 2013–2016 гг. дана характеристика эпизоотической ситуации в странах СНГ в 2013–2015 гг. В них сохраняется неблагополучие территорий по таким особо опасным болезням животных, как бешенство, африканская чума свиней, оспа овец и коз, ящур, сибирская язва и др.

Ключевые слова: эпизоотическая ситуация, государства — участники СНГ, информированность, координация действий.

UDC 619:616.98:616-036.22(47+57)

## ANALYSIS OF HIGHLY DANGEROUS AND ECONOMICALLY IMPORTANT ANIMAL DISEASE SITUATION IN CIS COUNTRIES IN 2013–2015<sup>2</sup>

D.A. Lozovoy

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

## SUMMARY

The epizootic situation in the CIS Member States for 2013–2015 was characterized on the basis of materials provided by heads of the veterinary services of the CIS Member States to the CIS Executive Committee, on the basis of the OIE data supplemented by information from the Rosselkhoznadzor Information Analysis Centre and taking into account reports from the meetings of the CIS Intergovernmental Council for Veterinary Cooperation for 2013–2016. Their territories remain infected with highly dangerous animal diseases such as rabies, African swine fever, sheep and goat pox, foot-and-mouth disease, anthrax, etc.

Key words: epizootic situation, CIS Member States, awareness, coordination of actions.

Животноводство в государствах — участниках СНГ является важнейшей отраслью производства продовольствия. Одной из основных проблем на пути его устойчивого развития является неблагополучная обстановка по заразным болезням животных. На протяжении последних лет сохраняется неблагополучие территорий государств — участников СНГ по таким особо опасным болезням животных, как бешенство, африканская чума свиней, оспа овец и коз, ящур, сибирская язва и др.

Заразные болезни животных несут в себе не только социальную опасность, так как многие из них являются общими для человека и животных, но и наносят большой экономический ущерб, обуславливая миллиардные затраты на ликвидацию очагов заболеваний и проведение противоэпизоотических мероприятий. Знание текущей эпизоотической ситуации позволяет своевременно прогнозировать, планировать и координировать проведение диагностических и профилактических мероприятий и не допускать широкого

<sup>1</sup>Основные положения доклада на заседании Комиссии по экономическим вопросам при Экономическом совете СНГ 20 июля 2016 г.

<sup>2</sup>Key items of the report made at the meeting of the Commission on Economic Issues under the CIS Economic Council on the 20<sup>th</sup> of July, 2016.

распространения болезней животных. В соответствии с Соглашением государств — участников СНГ о сотрудничестве в области ветеринарии от 12 марта 1993 г. в целях координации совместных действий по предотвращению распространения инфекционных болезней животных и взаимного предохранения территорий от эпизоотий, которые наносят большой ущерб странам, на заседаниях Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ постоянно обсуждаются вопросы об эпизоотической ситуации в странах Сообщества. При этом учитываются существующие положения об обязательном предоставлении во Всемирную организацию здравоохранения животных (МЭБ) информации со стороны государств — членов МЭБ об эпизоотической ситуации в их странах и осуществляемых мерах по ее улучшению.

Принимаются во внимание сведения о болезнях животных, имеющих наибольшее значение для экономики стран и международной торговли и включенных в так называемый список болезней МЭБ (международное распространение, значительная заболеваемость или смертность для домашних или диких животных, опасность для людей и др.). В 2015 г. в нём числилось

90 болезней [1]. Эти официальные материалы, дополненные данными информационно-аналитического центра Россельхознадзора, а также периодические сообщения представителей ветеринарных служб государств — участников СНГ на заседаниях Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ послужили основой для анализа и обобщения имеющихся сведений (табл. 1 и 2). Выделение ряда болезней в группу «особо опасных» осуществлено в соответствии с приказами Минсельхоза России № 476 от 19.12.2011 г. «Об утверждении перечня заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)» и № 242 от 24.06.2013 г. «Об утверждении перечня заразных болезней животных, используемого для сельскохозяйственного страхования с государственной поддержкой».

Как видно из табл. 1 и рисунка, наибольшее распространение в странах СНГ имеет **бешенство**. Эта вирусная инфекция с высокой летальностью регистрировалась за анализируемый период в 9 из 11 стран, особенно часто в России, Украине и Р. Беларусь. К воз-

Таблица 1

Сведения об эпизоотической ситуации по особо опасным болезням животных в государствах — участниках СНГ в 2013–2015 гг.

Страны	Болезни, количество очагов по годам: 2013/2014/2015 гг.						
	Бешенство	Ящур	Африканская чума свиней	Оспа овец и коз	Сибирская язва	Нодулярный дерматит КРС	Высоко-патогенный грипп птиц
Азербайджанская Р.	22/24/20	–	–	–	1/0/0	0/16/0	–
Р. Армения	–	0/0/2	–	–	1/0/0	0/0/2	–
Р. Беларусь	405/329/451	–	4/0/0	–	–	–	–
Р. Казахстан	–	3/0/0	–	1/0/3	0/1/+	–	0/0/1
Кыргызская Р.	58/43/73	0/1/0	–	10/0/1	1/0/1	–	–
Р. Молдова	111/130/159	–	–	–	2/1/3	–	–
Российская Федерация	3003/2096/3614	21/11/0	228/80/85	7/0/9	6/3/2	0/0/17	0/2/6
Р. Таджикистан	49/63/48	2/0/0	–	7/3/0	1/6/2	–	–
Туркменистан	+ / + / 6	–	–	0 / + / 0	–	–	–
Р. Узбекистан	+ / 20 / 6	–	–	–	–	–	–
Украина	1293/898/1174	–	0/11/39	–	–	–	–

«–» — болезнь не регистрировалась;

«+» — болезнь регистрировалась.

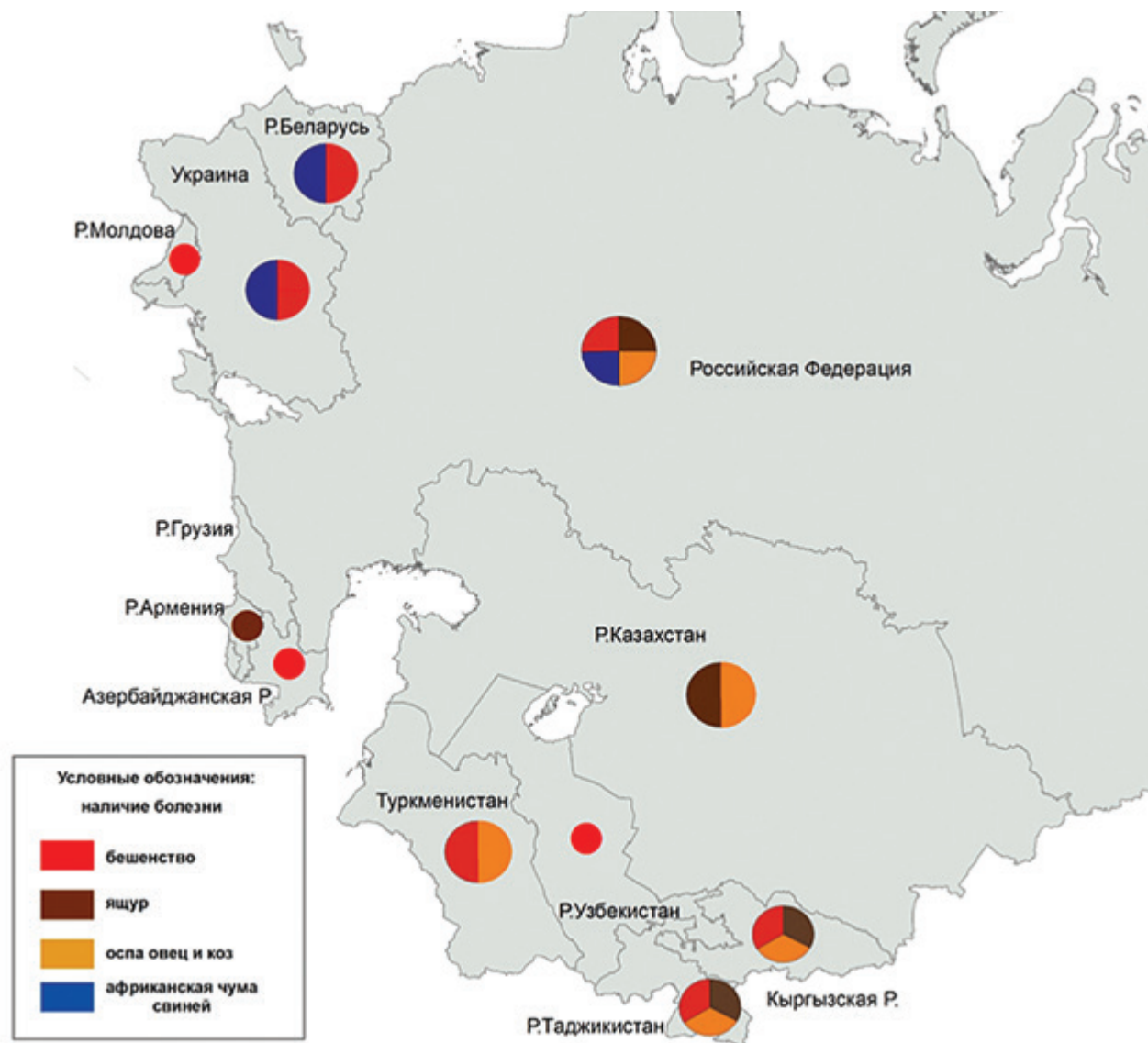


Рис. Эпизоотическая ситуация по некоторым особо опасным болезням животных в странах СНГ в 2013–2015 гг.

будителю болезни чувствительны человек и все виды теплокровных животных, особенно представители семейства собачьих (лисица, волк, шакал, енотовидная собака), а также грызуны многих видов и домашняя кошка. Мероприятия по борьбе с бешенством включают в первую очередь вакцинацию плотоядных диких животных, домашних и сельскохозяйственных животных, а также контроль численности бродячих собак и кошек. Эти мероприятия требуют больших материальных затрат и трудны в исполнении. Вполне обоснованно вопросы об эпизоотической и эпидемиологической обстановке по бешенству в странах СНГ и мерах борьбы с ним обсуждались на заседаниях Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ в феврале 2015 г. в г. Сочи и в мае 2016 г. в Брестской области Р. Беларусь. На последнем заседании ФГБУ «ВНИИЗЖ», как центру МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней

животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья, поручено подготовить к очередному заседанию совета в 2017 г. проект Комплекса совместных действий государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.

**Ящур** в 2013–2015 гг. был зарегистрирован в пяти странах [9–12]. По официальным данным, в мае–июле 2013 г. заболевание КРС ящуром отмечено в Р. Казахстан в Восточно-Казахстанской области, граничащей с Китаем. При лабораторном исследовании проб патологического материала от животных из эпизоотических очагов, проведенном ФГБУ «ВНИИЗЖ», установлен вирус ящур, принадлежащий к генетической линии А/Юго-Восточная Азия-97 (А/SEA-97). Близкородственный изолят вируса ящур типа А был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала, доставленных от животных из Монголии. В марте,

Таблица 2  
Сведения об эпизоотической ситуации по экономически/социально значимым болезням животных в государствах — участниках СНГ в 2013–2015 гг.

Страны	Болезни, количество очагов по годам: 2013/2014/2015 гг.					
	Бруцеллёз	Туберкулез	Лейкоз КРС	Геморрагическая септицемия	Классическая чума свиней	Ньюкаслская болезнь
Азербайджанская Р.	132/145/79	–	–	–	–	–
Р. Армения	0/0/39	–	–	–	–	–
Р. Беларусь	–	–	–	+ / + / 0	–	–
Р. Казахстан	+ / + / +	–	–	0/0/4	–	1/0/0
Кыргызская Р.	1701/3/2	–	–	–	–	–
Р. Молдова	–	–	12/11/5	–	–	–
Российская Федерация	254/315/550	22/8/11	461/354/271	–	2/6/3	–
Р. Таджикистан	136/317/82	–	–	–	–	–
Туркменистан	7/7/3	–	–	–	–	0/1/0
Р. Узбекистан	–	–	–	–	–	–
Украина	–	6/2/1	6/10/9	–	0/0/1	–

«–» — болезнь не регистрировалась;  
«+» — болезнь регистрировалась.

а затем в сентябре–октябре 2013 г. в России в пограничных с Китаем районах Забайкальского края отмечены вспышки ящура, вызванные тем же возбудителем. По данным Всемирной референтной лаборатории МЭБ по ящуре (WRL-FMD, Пербрайт, Великобритания), выделенные на территории Забайкальского края России, Казахстана и Монголии изоляты на 99% идентичны китайским изолятам. В июне 2013 г. заболевание ящуром среди КРС отмечено и на Северном Кавказе в Карачаево-Черкесской Республике, граничащей с Грузией, а затем в Краснодарском крае и Кабардино-Балкарской Республике. При лабораторном исследовании был установлен вирус ящура, относящийся к генетической линии А/Иран-05. Изоляты данной генетической линии в 2011–2013 гг. вызывали вспышки ящура на территории стран Ближнего Востока.

Во второй половине 2013 г. очаги ящура типа А отмечались и в Амурской области, граничащей с Китаем. В 2014 г. единичные случаи ящура типов А и О зарегистрированы в Забайкальском крае вблизи границ с Китаем и Монголией. В мае 2014 г. ящур типа О получил распространение среди свинополовья в Спасском районе Приморского края, граничащего с Китаем [2, 7, 8]. Возникновение ящура в 2013–2014 гг. в субъектах РФ было обусловлено заносом новых штаммов из сопредельных территорий, т.к. во время вспышек были выделены изоляты вируса ящура, антигенно родственные тем вирусам, которые циркулировали в соседних странах. Своевременная диагностика вспышек ящура, идентификация выделенных изолятов, срочное изготовление вакцин с использованием новых штаммов и их оперативное применение в неблагополучных зонах позволило купировать и ликвидировать ящурные очаги. Благодаря этому, в 2015 г. новых очагов ящура

на территории России не возникало. В мае 2016 г. на 84-й Генеральной сессии МЭБ принято решение о признании Российской Федерации страной с зоной, благополучной по ящуре без вакцинации, включающей 50 регионов, которые более 20 лет являются благополучными по ящуре. Из других стран следует отметить Кыргызскую Р., в которой в августе 2014 г. отмечено заболевание ящуром КРС на пастбище в Таласской области [10].

В 2015 г. в ряде стран Среднего Востока (Турция, Иран, Саудовская Аравия) были отмечены вспышки ящура, вызванные новым штаммом типа А генотипа G-VII [11, 12]. В конце декабря 2015 г. в Р. Армения, на границе с Турцией, наблюдали заболевание ящуром среди КРС и свиней. При исследовании в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в патматериале от животных был установлен вирус типа А генотипа G-VII, который после соответствующей подготовки был депонирован и использован для приготовления противоящурной вакцины. Приготовленная в ФГБУ «ВНИИЗЖ» вакцина из этого штамма в марте 2016 г. была отправлена и с положительным эффектом применена в Р. Армения.

**Африканская чума свиней** представляет собой одну из самых экономически значимых болезней, которой с высокой летальностью болеют домашние свиньи и дикие кабаны. В последние годы она получила широкое распространение за пределами Африки. Вирус устойчив во внешней среде, распространению его способствуют многочисленные факторы и пути заноса. Весной 2007 г. заболевание отмечено в Грузии, затем быстро распространилось в Р. Армения, Азербайджанскую Р. и Россию. В 2012 г. установлена на территории Украины, в 2013 г. — в Р. Беларусь, в 2014 г. — в Польше, Литве, Латвии и Эстонии. Разработаны методы диагно-

стики болезни, проводятся строгие ветеринарно-санитарные мероприятия по недопущению заноса и распространения болезни, но на ближайшую перспективу отсутствуют средства специфической профилактики.

**Оспа овец и коз** регистрировалась в пяти странах [9–12]. Сложная ситуация по оспе овец и коз сложилась на территории Монголии. Своевременная профилактическая вакцинация животных позволяет купировать заболевание и ограничить его распространение.

**Сибирская язва** — опасная инфекционная болезнь сельскохозяйственных и диких животных всех видов, а также человека, характеризуется высокой летальностью (90–100%). Случаи сибирской язвы регистрировались в анализируемый период в большинстве государств — участников СНГ.

**Нодулярный дерматит** (заразный узелковый дерматит КРС) — контагиозная вирусная болезнь, характеризуется лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (бугорков), поражением глаз и слизистых оболочек органов дыхания и пищеварения, абортными, исхуданием и резким снижением молочной продуктивности. Возбудитель — ДНК-вирус, относящийся к семейству *Poxviridae* (оспенный), имеет близкое родство с возбудителями оспы овец и коз. Наиболее чувствительны к заражению лактирующие коровы и телята. Вирус выделяется с выдыхаемым воздухом, слюной, истечениями, молоком. Основной путь распространения — различными членистоногими, особенно кровососущими. Болезнь регистрировалась главным образом в Африке, в последнее время в странах Ближнего Востока. В 2014 г. заболевание установлено в Азербайджанской Р., в 2015 г. — в Р. Армении и Российской Федерации (Дагестан, Чеченская Республика, Северная Осетия) [10, 11]. Диагностика нодулярного дерматита в России впервые осуществлена сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» [5, 6]. В июле 2016 г. болезнь зарегистрирована и в Р. Казахстан (в Атырауской области) [12]. Существуют методы лабораторной диагностики болезни, для профилактики рекомендуется использовать вакцину против оспы овец и коз [3, 4].

**Грипп птиц** (классическая чума птиц) — острая вирусная болезнь, характеризуется поражением органов пищеварения, дыхания, высокой летальностью. Различные штаммы вируса могут вызывать от 10 до 100% гибели среди заболевших и поражать одновременно от одного до трех видов птиц. В течение 2013–2015 гг. сообщений о гриппе среди сельскохозяйственных птиц на территории государств — участников СНГ в МЭБ не поступало. Случаи выявления вируса высокопатогенного гриппа птиц H5N1 в дикой орнитофауне зарегистрированы в Р. Казахстан (2015) и в Российской Федерации (2014, 2015).

Из экономически/социально значимых болезней (табл. 2) большой ущерб наносят **бруцеллез**, которым болеют КРС, МРС, свиньи, а также человек, и **лейкоз** КРС. Наибольшее количество очагов бруцеллеза отмечалось в странах с развитым овцеводством (Азербайджанская и Кыргызская Р., Российская Федерация и Р. Таджикистан), меньше в других государствах.

Из остальных болезней следует упомянуть вспышки в 2013–2015 гг. вирусной диареи (20/9/8) и инфекционного ринотрахеита КРС (26/18/16) в Р. Беларусь, болезни Ауески (5/1/1) в Украине, контагиозной

плевропневмонии коз (23/6/1) и чумы мелких жвачных (4/0/0) в Р. Таджикистан, случной болезни лошадей (79/92/18) в Кыргызской Р. Эти болезни не получили широкого распространения и занимают небольшую долю в инфекционной патологии животных.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что вопросы эпизоотической ситуации в странах СНГ постоянно обсуждаются на заседаниях Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ. При этом руководителям ветеринарных служб государств — участников СНГ рекомендуется продолжать работу по обеспечению эпизоотического благополучия своих территорий, усилить информированность между ветеринарными службами об эпизоотической ситуации в странах, а также координацию совместных действий по ее улучшению.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

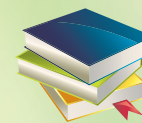
1. Критерии включения болезней, инфекций и инфестаций в список МЭБ // МЭБ. Кодекс здоровья наземных животных. — 24-е изд. — 2015. — Т. 1. — С. 4–7.
2. Лозовой Д.А., Рахманов А.М. Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в 2013–2015 гг. и меры борьбы с ним // Ветеринария сегодня. — 2016. — № 1 (16). — С. 38–42.
3. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота в Республике Северная Осетия – Алания / В.Н. Герасимов, А.В. Луницин, Н.И. Сальников [и др.] // Ветеринария. — 2016. — № 3. — С. 11–13.
4. Петрова О.Н., Караулов А.К. Анализ ситуации по нодулярному дерматиту и идентификация опасности его распространения в Российской Федерации // БИО. — 2016. — № 1/2 (184–185). — С. 24–29; № 3 (186). — С. 20–22.
5. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, А.В. Кононов [и др.] // Ветеринария Кубани. — 2015. — № 5. — С. 3–6.
6. Результаты генодиагностики нодулярного дерматита в Дагестане и Чеченской Республике — первое официальное подтверждение болезни на территории Российской Федерации / М.В. Бирюченкова, А.М. Тимина, Н.Г. Зиняков, А.В. Щербаков // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 4 (15). — С. 43–45.
7. Щербаков А.В. Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура) // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3 (14). — С. 30–36.
8. Эпизоотологические особенности ящура типа А, вызванные гетерологичными штаммами вируса / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, В.В. Дрыгин [и др.] // Ветеринария. — 2014. — № 11. — С. 20–24.
9. OIE. Disease Information. — 2013. — Vol. 26. — № 1–52.
10. OIE. Disease Information. — 2014. — Vol. 27. — № 1–52.
11. OIE. Disease Information. — 2015. — Vol. 28. — № 1–53.
12. OIE. Disease Information. — 2016. — Vol. 29. — № 1–33.

## ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

- Редакция «Ветеринарии сегодня» ([http://www.arriah.ru/main/veterinary\\_today/about](http://www.arriah.ru/main/veterinary_today/about)) рассмотрит возможность для публикации Ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия – представление основных направлений развития ветеринарной науки, привлечение внимания мировых научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии, формирование и развитие единого мирового научного знания.
- Мы публикуем статьи как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и для новых научных дискуссий.
- Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» («ВНИИЗЖ»). Статьи публикуются на двух языках: русском и английском. Тематическое содержание журнала меняется в зависимости от текущих задач науки и практики. Журнал распространяется по всей территории России, а также в крупнейших мировых научных центрах.

### ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



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



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

### ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

- К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10–12 страниц – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы). В случае, если у вас нет возможности перевести статью самостоятельно, редакция в индивидуальном порядке готова помочь решить эту проблему.  
*\*Предоставление в редакцию рукописи статей является подтверждением согласия автора на использование его произведения как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник. Материалы направляются в редакцию с сопроводительным письмом от организации автора (форма на сайте).*

### СТРУКТУРА ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ\*

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

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

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

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

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

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

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

### УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

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, e-mail: lavruhina@arriah.ru



**ФГБУ «ВНИИЗЖ» образовано в 1958 г.  
как Всесоюзный научно-исследовательский ветеринарный институт (ВНИИВ).**  
**Сегодня учреждение является уникальным,  
признанным во всем мире центром  
по решению проблем здоровья животных и птиц.**

**ОСНОВНЫМИ НАПРАВЛЕНИЯМИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРА  
В ОБЛАСТИ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ СВИНЕЙ ЯВЛЯЮТСЯ:**

– разработка и внедрение в ветеринарную практику высокоэффективных лечебно-профилактических и диагностических препаратов против болезней свиней.

**ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ**

**ВАКЦИНЫ:**

- против инфекционных болезней свиней: пастереллеза, сальмонеллеза, гемофильного полисерозита свиней, актинобациллезной плевропневмонии свиней, репродуктивно-респираторного синдрома, парвовирусной инфекции, болезни Ауески и трансмиссивного гастроэнтерита свиней;
- против ящура всех типов.

**ПРОВОДИТ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

- диагностические исследования на ящур всех типов;
- диагностические исследования на наличие вируса АЧС и КЧС;
- выделение вируса болезни Ауески в культуре клеток;
- обнаружение респираторных болезней свиней;
- исследования на наличие коронавирусов свиней;
- мониторинговые и скрининговые исследования инфекционных болезней свиней;
- дифференциальная диагностика желудочно-кишечных болезней;
- дифференциальная диагностика болезней свиней, протекающих с поражением центральной нервной системы.

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

Важным аспектом деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» является оказание научно-методической и практической помощи ветеринарным специалистам лабораторий и животноводческих предприятий, разработка мероприятий для профилактики и ликвидации инфекционных болезней свиней. Ученые Центра ведут научное сопровождение продукции ФГБУ «ВНИИЗЖ»



и непрерывную консультативную деятельность в хозяйствах. Учреждение осуществляет подготовку научных кадров – аспирантов и соискателей, обучение специалистов, стажеров и практикантов, а также проводит курсы повышения квалификации по вопросам диагностики, профилактики и мер борьбы с инфекционными болезнями животных.

**Контакты:**

**Почтовый адрес:** Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,  
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Сектор продаж ветпрепаратов на территории РФ:** тел. (4922) 26-15-25, 26-15-51, 52-99-24

**Сектор экспорта и импорта ветпрепаратов:** тел. (4922) 26-18-56

**Отдел маркетинга и рекламы:** тел. (4922) 26-15-12, 26-19-88, 26-17-65 (доб. 24-34)

**сайт:** <http://www.arriah.ru>

**канал на Youtube:** <https://www.youtube.com/channel/UCVPBOvjlZcxbEmJ1Qw3YYcw>