

ISSN 2304-196X

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

# ВНИИЗЖ

# ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

МАРТ №1 {4} 2013



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



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

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

Деятельность осуществляется в соответствии с международными стандартами ISO 9001-2008

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(4) 2013 научный журнал

**Главный редактор:** Василий Александрович Грубый, доктор экономических наук, профессор, академик РАЕН, директор ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**Шеф-редактор:** Анна Глаголева

**Выпускающий редакторы:** Ольга Борисова, Юлия Трофимова, Ольга Лесных, Юлиана Бададгулова  
**e-mail:** [veterinarytoday@yandex.ru](mailto:veterinarytoday@yandex.ru), **тел.:** +7915 477 78 36

### Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

– **В.В. Дрыгин** – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ» – заместитель главного редактора;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Дизайн и верстка:** Олеся Михайлина

**Корректор:** Анастасия Перекрестова

**Менеджер по подписке и дистрибуции:** Алексей Липатов +7 (925) 357 20 61

Журнал «Ветеринария сегодня» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций, свидетельство о регистрации № ФС77-47033 от 21 марта 2012 г. Тираж 1000 экземпляров. Цена свободная.

**Учредитель:** ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Издатель:** ООО «Успех-МЕДИА»  
105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д.13, оф. 402

**Адрес редакции:** 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**Типография:** ЗАО «Группа-Море», г. Москва, Хохловский переулок, д. 7-9,  
тел.: (495) 917-42-28

Подписано в печать 28 февраля 2013 года

## СОДЕРЖАНИЕ

- 5 А.М. Рахманов, В.Л. Узюмов  
**К истории организации и деятельности Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института**
- 8 В.В. Макаров, Джоханнес Шоопала, С.И. Джулина, О.И. Сухарев  
**Блютанг в начале 21 века: реальная эпизоотология**
- 11 Juliette Ben Arous, Laurent Dupuis, А. Спиридонов, Р. Яшин  
**Роль адъювантов в разработке эффективных и безопасных вакцин для птиц**
- 17 А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, Д.В. Федосов  
**Морфофункциональные изменения у эшерихий, пастерелл и золотистого стафилококка под влиянием бактерицидных концентраций комплексного антимикробного препарата диоксиген**
- 29 П.И. Репин, И.П. Пчелкина, И.А. Чвала, Н.Г. Зиняков, В.В. Дрыгин  
**Биологические свойства вируса ньюкаслской болезни, выделенного в 2010 году из популяции голубей в Кемеровской области**
- 39 А.В. Саввин, О.Н. Петрова, Н.С. Бардина, С.А. Дудников, О.Ю. Горюшев, С.Г. Ремыгаа  
**Эпизоотологическое расследование вспышек африканской чумы свиней (на примере эпизоотии в Краснодарском крае)**
- 49 А.В. Бельчихина, М.А. Шибаяев, С.А. Дудников  
**Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Владимирской области**

## CONTENTS

- 14 Juliette Ben Arous, Laurent Dupuis, Artem Spiridinov, Roman Yashin  
**Importance of adjuvans for the development of efficient and safe avian vaccines**
- 23 A.G. Shakhov, L.Yu. Sashnina, D.V. Fedosov  
**Morphofunctional changes in *Escherichia*, *Pasteurella* and *Staphylococcus aureus* induced by bactericidal concentrations of complex antimicrobial drug dioxigenum**
- 34 P.I. Repin, I.P. Pchelkina, I.A. Chvala, N.G. Zinyakov, V.V. Drygin  
**Biological properties of Newcastle disease virus isolated from pigeon population in Kemerovo oblast in 2010**
- 44 A.V. Savvin, O.N. Petrova, N.S. Bardina, S.A. Dudnikov, O.Y. Goryushev, S.G. Remyga  
**Porcine actinobacillus pleuropneumonia: diagnosis, prophylaxis and control measures**
- 54 A.V. Belchikhina, M.A. Shibayev, S.A. Dudnikov  
**Retrospective analysis of rabies epidemic situation in Vladimir oblast**



УДК 619:578.835.2:001.89:63

## К ИСТОРИИ ОРГАНИЗАЦИИ И ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ВСЕСОЮЗНОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЯЩУРНОГО ИНСТИТУТА

А.М. Рахманов<sup>1</sup>, В.Л. Узюмов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>доктор ветеринарных наук, профессор ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail@arriah.ru

<sup>2</sup>доктор ветеринарных наук, профессор, г. Владимир

В связи с предстоящим в августе 2013 года 55-летием ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ранее известным, как Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт-ВНИИЯИ) редколлегия журнала наметила опубликовать материалы, посвященные этой дате. Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт МСХ СССР был создан как уникальное в нашей стране научное учреждение в ветеринарии. В журнале приведены материалы по созданию ВНИИЯИ, основные итоги научных исследований в период с 1958 по 1992 гг., описаны комплектование института кадрами и их подготовка, деятельность ВНИИЯИ как Координационного центра по проблеме ящура в СССР и для стран-членов СЭВ.

Ящур, эпизоотии и панзоотии которого часто отмечались во многих странах, давно привлекал к себе внимание научных исследователей и практических ветеринарных специалистов. И не случайно, что после открытия Д.И. Ивановским вируса табачной мозаики

(1892) ящур стал первым заболеванием животных, при котором в 1897 г. Леффлером и Фрошем была установлена вирусная этиология.

Серьезную разработку этой большой проблемы начали в 1926 году в Государственном институте экспериментальной ветеринарии (с 1930 г. – ВИЭВ), где сначала была создана группа, а затем специализированная ящурная лаборатория во главе с А.Л. Скомороховым, сотрудники которой при участии других лабораторий начали научные исследования по ящuru под руководством профессора С.Н. Вышелесского.

Однако результаты этих исследований были явно недостаточны, и в журнале «Практическая ветеринария» (1929, №6) А.Л. Скоморохов публикует статью «К вопросу об организации ящурного института» о необходимости строительства специализированного института по изучению ящура.



Вскоре в 1930-1932 гг. в Тверской области в 4,5 км от г. Осташково на острове Городомля (озеро Селигер) был построен первый в нашей стране ящурный институт, директором которого был назначен А.Л. Скоморохов. В институте были начаты широкие исследования по изучению ящура, о чем свидетельствует изданная сотрудниками института монография «Ящур в современном освещении» (1932). К сожалению, дальнейшая деятельность первого ящурного института вскоре была прекращена в связи с репрессиями, в том числе и в отношении ветеринарных специалистов, имевшими место в нашей стране в 30-е годы прошлого столетия.

В послевоенные годы в связи с широким распространением ящура в СССР вновь остро встал вопрос о создании ящурного института. В соответствии с решением государственных органов СССР Министерством сельского хозяйства СССР было приказано построить научно-исследовательский ящурный институт (приказ от 20 августа 1958 года) с нахождением во Владимирском районе Владимирской области (приказ МСХ СССР от 27 июня 1960 года). Институту был выделен участок земли в 2 км от поселка Юрьеvec (в 6 км от г. Владимир) для строительства основных зданий института.

Перед создателями института стояла сложная задача: на пустом месте при отсутствии каких-либо коммуникаций нужно было построить современный научно-исследовательский центр, отвечающий самым высоким требованиям ветеринарно-санитарного режима и обеспечивающий экологическую безопасность проведения обширных экспериментов с вирусом. В те годы ущерб от ящура исчислялся миллиардами рублей, т.к. не было надежных методов диагностики болезни и идентификации вируса, отсутствовали вакцины, в связи с этим практически невозможно было эффективно осуществлять противоящурные мероприятия.

Основное строительство научно-исследовательских лабораторий и других сооружений было закончено в 1966 году. Однако затем было решено построить экспериментально-производственный корпус (ЭПЛ) для отработки производства промышленных серий противоящурных вакцин, и титражный корпус для контроля вакцин на естественновосприимчивых животных. Их строительство было завершено в 1984 году.

Одновременно со строительством института с 1962 года начали возводить жилье для сотрудников в г. Вла-

димире. Затем строительство было перенесено в поселок Юрьеvec, где был создан институтский городок с необходимой инфраструктурой. В общей сложности было построено более 1200 квартир, общежитие для аспирантов, средняя школа на 1000 учащихся, два типовых детских сада, больница с поликлиникой, несколько магазинов, детская кухня и др. После завершения строительства ЭПЛ и создания базы для промышленного изготовления и контроля биопрепаратов началось серийное производство вакцин с использованием современного оборудования и разработанных передовых технологий. Во ВНИИИ были созданы уникальные возможности научно-производственного комплекса, позволяющего не только проводить всесторонние комплексные научные исследования, но и реализовывать и внедрять в практику полученные научные разработки.

Первоначально в институте были созданы лаборатории культивирования клеток и вируса с группой эпизоотологии, лаборатория диагностики, лаборатория сушки биопрепаратов, лаборатория биохимии. В 1964 году был сдан в эксплуатацию первый лабораторный корпус, где были размещены кроме вышеназванных лаборатории: культивирования клеток, иммунологии, живых вакцин, эпизоотологии. В 1965 году был введен в эксплуатацию второй лабораторный корпус и виварные корпуса с соединительной галереей, мусоросжигательными печами, а также хозяйственные вспомогательные постройки (прачечная, мастерские, склады, гараж и др.). Во втором лабораторном корпусе были размещены еще лаборатории биофизики, патоморфологии и цитопатологии, инактивированных вакцин, ОНТИ с библиотекой. Одной из первоочередных задач, стоявших перед созданным институтом, была разработка методов и средств диагностики ящура. Опыт работы по диагностике ящура был обобщен в виде брошюр «Методики по идентификации типов и вариантов вируса ящура» (1970) и «Методические указания по выделению и идентификации штаммов вируса ящура» (1973), которые были рекомендованы Главным управлением ветеринарии МСХ СССР для практического использования ветеринарной службой страны.

В институте с 1965 года было освоено производство высокоактивных и специфических диагностикумов на ящур всех типов и актуальных подтипов. Сотрудники лаборатории диагностики вели активную работу по созданию уникального музея штаммов вируса ящура и ящуроподобных заболеваний животных. В 1984 г. за разработку методов диагностики особо опасных инфекционных болезней животных группа ученых страны отмечена премией Совета Министров СССР, среди которых были заведующие лабораториями ВНИИИ Ж.А. Шажко, Ю.Ф. Швецов.

Для борьбы с ящуром нужны были эффективные противоящурные вакцины, которых в стране не было. Первые серии инактивированных ГОА-вакцин готовили из вируса, полученного путем его репродукции в организме 2-3-дневных крольчат, но они, в основном, вызывали слабый и непродолжительный иммунитет у вакцинированных животных, иногда обладали остаточной вирулентностью. И только после того, как в их состав в качестве адъюванта был включен сапонин, они стали более иммуногенными. В дальнейшем в институте были проведены обширные исследования по их усовершенствованию. Производство лапинизированных ГОА-сапониновых формолвакцин было внедрено на биофабриках страны.

Была выполнена большая работа по подбору и обоснованию адъювантов, подходящих для изготовления инактивированных эмульсионных вакцин, пригодных для вакцинации крупного, мелкого рогатого скота и свиней. Вакцины, полученные из концентрированного вируса, обладали высокой иммуногенной активностью и вызвали образование напряженного иммунитета у КРС, МРС и свиней. Были проведены исследования по подбору различных инактиваторов, обеспечивающих полную инактивацию вируса ящура с сохранением иммуногенности антигена. Такими инактиваторами оказались производные азиридинов, которые сейчас широко используются при производстве противоящурных и других вакцин.

В дальнейших опытах для производства вакцины стали использовать вирус ящура, который культивировали в перевиваемой культуре клеток ВНК-21. Культуральные вакцины широко применялись и применяются у нас в стране для профилактики ящура. В последующие годы были разработаны универсальные культуральные вакцины, в которых антиген вируса сконцентрирован в 20-100 раз, способные обеспечивать защиту животных через 2-3 дня после применения продолжительностью до года и более. Для длительного хранения были разработаны сухие инактивированные вакцины против ящура разных типов с применением метода распылительной сушки. Учеными института много внимания уделялось изучению постинфекционного и поствакцинального иммунитета у животных разных видов и возрастных групп, а также разработке схем вакцинации животных против ящура. В настоящее время институт выпускает противоящурные культуральные инактивированные сорбированные и эмульсионные вакцины, отвечающие требованиям МЭБ.

Обстоятельные исследования по изучению эпизоотологии ящура, разработка и совершенствование системы противоящурных мероприятий, внедрение их в ветеринарную практику в отдельных регионах и в стране в целом, позволили достичь положительных результатов в деле ликвидации ящура. С учетом полученных результатов были разработаны инструкции о мероприятиях по предотвращению и ликвидации заболевания животных ящуром (1965, 1971, 1985), везикулярной болезни свиней (1972, 1975).

Были подготовлены также методика по изучению краевой эпизоотологии ящура (1970), рекомендации по профилактике и ликвидации ящура в промышленных животноводческих комплексах по производству говядины и на площадках по откорму молодняка КРС (1981), рекомендации по профилактике и ликвидации заболевания свиней ящуром на свиноплощадках и в других хозяйствах по производству свинины. Была разработана система применения специфических средств профилактики ящура сельскохозяйственных животных с учетом региональных особенностей ведения животноводства в стране. С учетом результатов научных исследований нашего и других институтов, многолетнего отечественного и зарубежного опыта борьбы с ящуром была разработана наиболее экономичная в современных условиях для страны стратегия профилактики и борьбы с ящуром, которая в настоящее время успешно реализуется в России.

За успешное выполнение плановой тематики и внедрение полученных результатов в производство институт неоднократно награждался переходящим Красным Знаменем ЦК КПСС, Совета Министров СССР,



ВЦСПС и ЦК ВЛКСМ, Дипломами ВДНХ, МСХ СССР, денежными премиями.

Институтом издавались тематические сборники работ: «Ящур» том 1 (1970), том 2 (1974), научные труды и тезисы конференций. Кроме того, сотрудники института часто принимали участие во Всесоюзных, Всероссийских и Международных конференциях, симпозиумах и съездах. Статьи сотрудников систематически публиковались в периодических отечественных и зарубежных изданиях (журналы «Ветеринария», «Вопросы вирусологии», «Доклады ВАСХНИЛ», «Доклады РАСХН», «Вестник ВАСХНИЛ», «Вестник РАСХН», «Аграрная Россия», «Животноводство России» и др.). Всего за прошедшие годы сотрудники института опубликовали в печати около 3000 научных работ.

В институте в течение многих лет плодотворно работали лауреаты Государственной премии РФ член-корреспондент РАСХН профессор А.А. Гусев, профессора А.И. Дудников и Ж.А. Шажко, а также Заслуженные деятели науки РФ – профессора А.М. Рахманов, В.Л. Узюмов, Ю.А. Черняев, Заслуженный изобретатель РФ – профессор В.А. Мищенко, 12 научных сотрудников стали «Заслуженными ветеринарными врачами РФ».

Приказом Министерства высшего образования СССР от 1 апреля 1964 года ВНИИИ было дано разрешение на подготовку научных кадров через аспирантуру, в которой прошло обучение 250 человек. В 1976 году по приказу ВАК СССР в институте был создан специализированный совет, который имел право присуждать ученые степени кандидата наук. За время работы он рассмотрел более 170 диссертаций и присудил ученую степень кандидата ветеринарных или биологических наук.

В 60-80-е годы XX века ВНИИИ являлся Координационным Центром по проблеме ящура в СССР и для стран-членов Совета экономической взаимопомощи (СЭВ). В те годы на базе института проводились ежегодные Всесоюзные Координационные совещания научных, производственных предприятий и ветеринарных учреждений СССР, принимавших участие в разработке методов и средств диагностики, профилактики и мер борьбы с ящуром животных.

Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт за годы функционирования приобрел немалый опыт сотрудничества с научными институтами, университетами, фирмами и ветеринарными органами как внутри страны, так и за ее пределами.

*(Продолжение следует...)*

# БЛЮТАНГ В НАЧАЛЕ 21 ВЕКА: РЕАЛЬНАЯ ЭПИЗООТОЛОГИЯ\*

UDC 619:616.98:578.823.1

## BLUETONGUE IN THE EARLY 21 CENTURY: REAL EPIDEMIOLOGY\*

В.В. Макаров<sup>1</sup>, Джоханнес Шоопала<sup>2</sup>, С.И. Джупина<sup>3</sup>, О.И. Сухарев<sup>4</sup><sup>1</sup> доктор биологических наук, профессор; Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва, e-mail: vvm-39@mail.ru<sup>2</sup> кандидат ветеринарных наук; Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва<sup>3</sup> доктор ветеринарных наук, профессор; Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва<sup>4</sup> доктор ветеринарных наук; Российский университет дружбы народов (РУДН), г. МоскваV.V. Makarov<sup>1</sup>, Johannes Shoopala<sup>2</sup>, S.I. Dzipina<sup>3</sup>, O.I. Sukharev<sup>4</sup><sup>1</sup> Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow, e-mail: vvm-39@mail.ru<sup>2</sup> Candidate of Science (Veterinary Medicine), Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow<sup>3</sup> Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow<sup>4</sup> Doctor of Science (Veterinary Medicine), Peoples' Friendship University of Russia (PFUR), Moscow

### РЕЗЮМЕ

Исследование посвящено характеристике особенностей современной эпизоотологии блютанга в реальных условиях традиционного нозоареала эндемичной Южной Африки (Республика Намибия). Стереотипными факторами территориально-временного, группового эпизоотического риска на основании их статистической оценки являются породная вариабельность восприимчивости овец, многолетняя и внутригодовая динамика погодно-климатических условий (температура и осадки), высокая превалентность среди крупного рогатого скота как резервуара природно-очаговой инфекции, видовая множественность вектора, полисеротиповая циркуляция возбудителя.

**Ключевые слова:** блютанг, овцы, крупный рогатый скот, эпизоотический процесс, эндемия.

### SUMMARY

Current bluetongue epidemiology features under the real conditions of conventional nozoarea in endemic South Africa (Republic of Namibia) are characterized in the paper. Stereotype spatial, temporal, group epidemic risk factors are determined based on their statistical assessment and are as follows: breed variability of sheep susceptibility, intra-year dynamics of weather and climate conditions (temperature and atmospheric precipitation), high prevalence in cattle as an endemic infection reservoir, vector species diversity, polyserotype agent circulation.

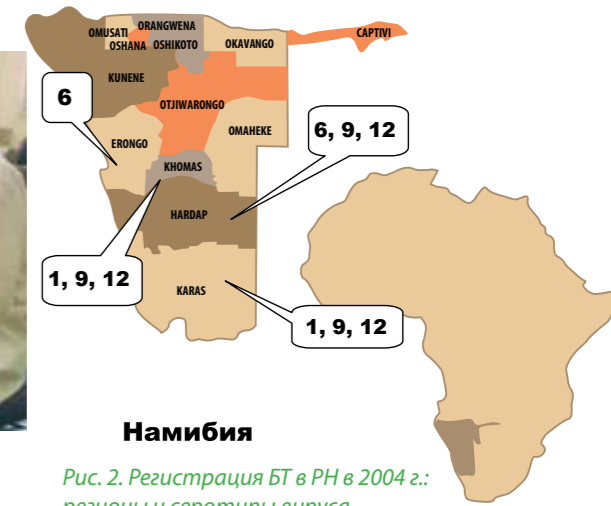
**Key words:** bluetongue, sheep, cattle, epidemic, endemic.

Блютанг (БТ) представляет эмерджентную проблему в Западной Европе и экстраполируется на территорию европейской части Российской Федерации. Проблема находится под пристальным контролем Россельхознадзора, МЭБ, ФАО, ЕС в связи с распространением инфекции (с 2006 г.) в северо-западной части континента и угрозой ее возникновения в РФ в процессе продолжающейся реализации национального проекта по интенсивным закупкам КРС в этом регионе. Согласно общей эпизоотологической и паразитосистемной концепции блютанга, в числе восприимчивых животных роль хозяина, с которым вирус поддерживает сбалансированное сосуществование/взаимодействие в форме доброкачественного переболевания и неопределенного по продолжительности бессимптомного вирусносительства, играет КРС, а овцы и отчасти козы служат эпизоотическим индикатором инфекции тупикового типа с чрезвычайно злокачественным течением и летальностью до 25% [3, 5].

Цель настоящей работы – проанализировать в контексте возрастающей актуальности проблемы эпизоотологические особенности БТ последних лет в условиях реальной эпизоотологии в традиционном нозоареале эндемичной Южной Африки (на модели Республики Намибия (РН)). Для этого представлялось интересным изучить и оценить факторы эпизоотического риска, в частности, зависимость заболеваемости от территориальных, экономических, природно-климатических условий, изучить видовую структуру переносчиков-мокрецов



Рис. 1. Дж. Шоопала в Центральной ветеринарной лаборатории РН



Намибия

Рис. 2. Регистрация БТ в РН в 2004 г.: регионы и серотипы вируса

рода *Culicoides*, оценить потенциал их основных представителей в эпизоотологии БТ, определить серотиповой пейзаж циркулирующего возбудителя.

Работа выполнена на базе кафедры ветеринарной патологии Российского университета дружбы народов (РУДН), государственных и региональных ветеринарных органов Государственного отдела ветеринарии, на Станции животноводства в Омачене и в Центральной ветеринарной лаборатории РН в период 2005–2012 гг.

Предметом исследования явились особенности проявления эпизоотического процесса БТ. Методическую основу составили принципы и методы, применяемые в кафедральной НИР [1]. Для анализа использованы материалы эпизоотологической статистики РН, собственные результаты обследования вспышек БТ. Учитывались природно-хозяйственные особенности регионов страны, эпизоотологическое зонирование, собранный материал систематизирован по природно-экономическим и хозяйственным зонам страны. Для выяснения отдельных вопросов поставлены эпизоотологические, энтомологические, вирусологические эксперименты, в частности, проведены серологические обследования КРС на БТ, серотипизация вируса в реакции нейтрализации, сбор мокрецов, определена их видовая принадлежность. Общие вопросы исследования решены в соответствии с принципами доказательной эпизоотологии, с применением методов систематического обзора и мета-анализа [2].

### Общая характеристика эпизоотического процесса блютанга в РН

РН состоит из тринадцати регионов. БТ распространен в четырех – центральных и южных. В других 9 регионах страны БТ не регистрируют (рис. 2). Заболевание клинически проявляется преимущественно среди овец высокопродуктивных пород (Дорпер, Дормер и Мерино), которые импортированы из Европы в колониальный период. Их разводят преимущественно в центральных регионах Эронго и Комас и в меньшей степени в северных коммунальных регионах. Местные породы овец (Дамара и Каракул) устойчивы к БТ.

Эпизоотическая ситуация БТ по регионам РН на рубеже веков за 14 лет представлена на рис. 3. Очевидно, что более других неблагополучие присуще южным регионам Хардап и Карас, где зарегистрировано по три серотипа вируса. Породы овец в этих регионах относятся к импортированным и высоко восприимчивы. Напротив, сравнительно благополучными остаются северные регионы с преобладанием овец местных устойчивых пород.

Как показано на рис. 4, заболеваемость прямо коррелирует с уровнем осадков. Максимальная заболеваемость, зарегистрированная в 1992, 1996 и 2000–2002 гг., характеризовавшихся обильными осадками, свя-

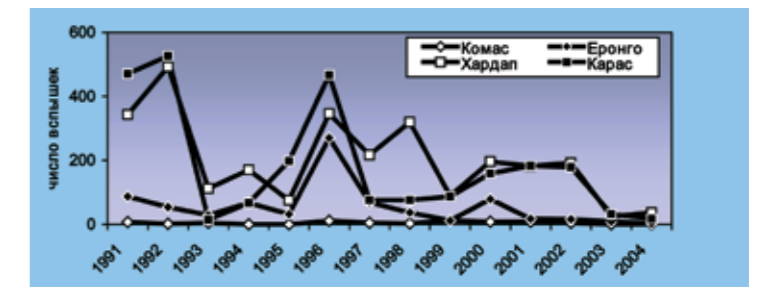


Рис. 3. Многолетняя динамика заболеваемости БТ в неблагополучных регионах РН

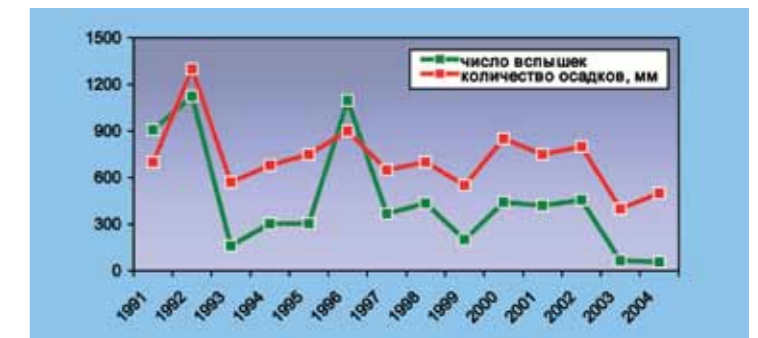


Рис. 4. Многолетняя динамика заболеваемости БТ и количества осадков

зана с благоприятными условиями для размножения переносчиков. В последующие годы эпизоотическая ситуация поддерживалась на уровне, близком к эндемичному.

### Сезонность вспышек БТ

Внутригодовая динамика БТ в РН (Южное полушарие!) характеризуется подъемом заболеваемости во второй половине лета и осенью (январь-апрель). Сравнительная сезонная динамика вспышек БТ среди овец и осадков в стране представлена на рис. 5. Динамика вспышек стереотипна и полностью коррелирует с динамикой месячных осадков. Осадки, выпавшие в ноябре и декабре (конец весны-начало лета), становятся основной базой для размножения и увеличения численности популяции переносчиков. Уже в январе они становятся половозрелыми, нападают на сельскохозяйственных животных и распространяют инфекцию от КРС овцам.

БТ в течение зимних месяцев (июнь-август) не регистрируется, поскольку в этот период не происходит активной жизнедеятельности мокрецов и их нападения на животных. В весенние месяцы (сентябрь, октябрь и ноябрь) инфекция также не распространяется; хотя для

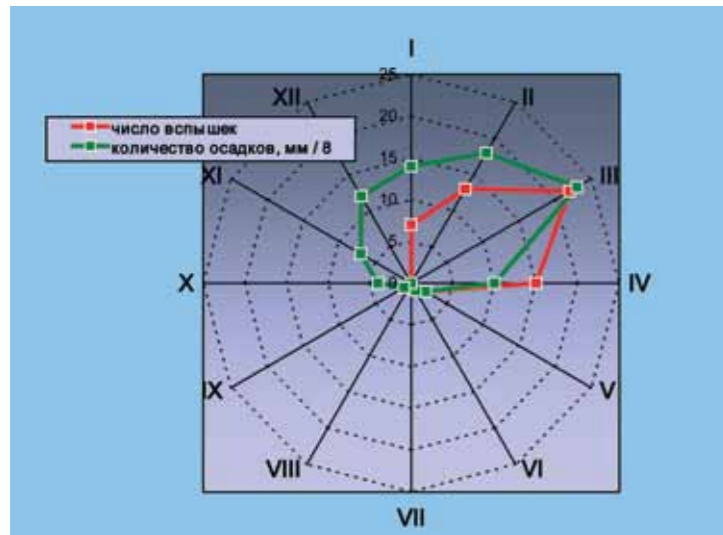


Рис. 5. Внутригодовая (помесячная) динамика заболеваемости БТ и количества осадков в 2004 г.

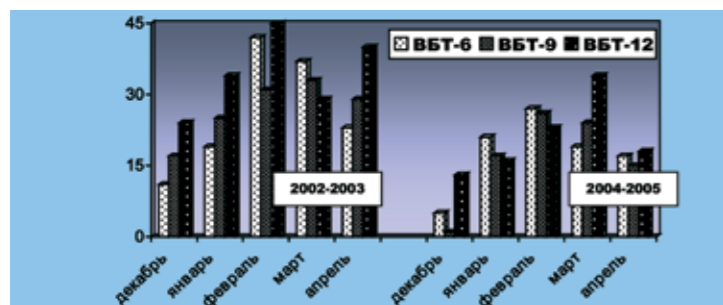


Рис. 6. Результаты серологического исследования КРС на БТ в 2002–2005 гг.

#### Численность мокрецов различных видов в РН (регион Комас)

Виды	2001–2002 гг.		2003–2004 гг.	
	n	%	n	%
<i>C. imicola</i>	10053	42,5	9684	38
<i>C. bolitinos</i>	4631	19,7	5789	23
<i>C. cornutus</i>	5329	22,7	7245	29
<i>C. miombo</i>	752	3,2	235	0,9
<i>C. loxodontis</i>	438	1,9	104	0,4
<i>C. debilipalpis</i>	812	3,5	607	2,4
<i>C. obsoletus</i>	84	0,3	143	0,6
<i>C. stellifer</i>	294	1,3	561	2
<i>C. sanguisuga</i>	432	1,8	73	0,3
Другие	630	2,7	864	3,4
Всего	23455	–	25305	–

этого периода характерен высокий уровень осадков, эти месяцы сопровождаются низкой температурой среды. Вирус БТ переносят только взрослые самки-кровососы, поэтому инфекция начинает проявляться в конце декабря, когда последние достигают полного развития.

Высокий уровень осадков в январе-марте продолжает стимулировать рост численности популяции переносчиков и активизирует передачу инфекции. В эти месяцы число вспышек БТ возрастает экспоненциально. В апреле уровень осадков резко снижается, снижается и число вспышек. С мая БТ практически не регистрируется. Самая высокая заболеваемость овец отмечается в течение января-апреля.

#### Превалентность БТ у крупного рогатого скота

БТ в популяции КРС как паразитосистемного хозяина и природного резервуара вируса оценивали по результатам выявления серопозитивности исследованием в реакции нейтрализации сывороток крови, полученных ежемесячно, с декабря по апрель в 2002–2003 и 2004–2005 гг. от КРС в регионе Комас, занимающем центральное географическое положение в стране. Результаты, суммированные на рис. 6, свидетельствуют об очень высоком уровне превалентности всех трех серотипов ВБТ, циркулирующих и поражающих овец в регионе, среди КРС (в среднем 20–30%) и значительном росте показателя (до 40% и выше) в пиковые периоды сезонной активации эпизоотического процесса.

#### Основные виды мокрецов рода *Culicoides* в РН

Отлов мокрецов проведен в регионе Комас в период их максимальной активности, с начала октября до конца апреля, преимущественно в ночное время суток, в 2001–2002 и 2003–2004 гг. Результаты их видовой идентификации, представленные в таблице, показывают, что 85–90% общей численности мокрецов составили только три вида – *C. imicola*, *C. bolitinos* и *C. cornutus* (индивидуально от 20 до 42,5%), среди которых основным вектором вируса БТ, как и во всей Южной Африке, является *C. imicola* [4]. Потенциальными переносчиками вируса в РН могут служить также достаточно распространенные *C. debilipalpis*, *C. miombo*, *C. stellifer* (от 0,9 до 3,2%).

#### Серотипы вируса БТ в РН

Особенности эпизоотологии БТ обусловлены серотиповым многообразием возбудителя [3]. В РН зарегистрировано четыре серотипа вируса БТ, территориальная приуроченность которых показана на рис. 2. В регионе Эронго от больных овец изолирован вирус 6 серотипа, в регионе Комас – 6, 9 и 12 серотипов, в регионах Хардап и Карас – 1, 9 и 12 серотипов. Принципиально важным представляется факт одновременной множественной циркуляции вируса БТ разных серотипов в пределах одной эпизоотии (территориальной единицы), обуславливающей необходимость применения поливалентных вакцин различной композиции.

Авторы выражают благодарность студентам ветеринарного отделения Российского университета дружбы народов (РУДН) Бадри Хансу Иннокенту (Республика Маврикий), Ольге Бурда, Анастасии Жерновой, Екатерине Гайворонской за существенную помощь в выполнении различных элементов НИР по теме в 2009–2012 гг.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Макаров В.В. Эпизоотологическая методология. – М.: РУДН, 2001. – 224 с.
- Макаров В.В. Доказательная эпизоотология // Ветеринария. – 2011. – № 4. – С. 57–62.
- Макаров В.В. Трансмиссивные экзотические инфекции животных на неэндемичных территориях // Пест-менеджмент. – 2012. – № 2. – С. 17–30.
- Tabachnick W. Culicoides and the global epidemiology of bluetongue virus // Vet. Ital. – 2004. – Vol. 40. – P. 145–150.
- Wilson A., Mellor P. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change // Parasitol. Res. – 2008. – Vol. 103. – P. 69–77.

УДК 619:616.98:636,52/58:615.371

## РОЛЬ АДЪЮВАНТОВ В РАЗРАБОТКЕ ЭФФЕКТИВНЫХ И БЕЗОПАСНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ПТИЦ

Juliette Ben Arous<sup>1</sup>, Laurent Dupuis<sup>2</sup>, А. Спиридонов<sup>3</sup>, Р. Яшин<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD, Marketing and Development Engineer for Vaccine Adjuvants; SEPPIC, France

<sup>2</sup> Research and Development Director; SEPPIC, France; E-mail: laurent.dupuis@airliquide.com

<sup>3</sup> ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир; E-mail: spiridonov@arriah.ru

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

#### РЕЗЮМЕ

Во время семинара «Использование адъювантов Montanide™ в производстве вакцин для птиц», который проходил в Дубае в ноябре 2012 г., научные сотрудники из SEPPIC и ФГБУ «ВНИИЗЖ» продемонстрировали результаты использования адъювантов в разработке вакцин для птиц.

Ключевые слова: вакцины для птиц, адъюванты, Montanide, грипп птиц, Ньюкасская болезнь.

Семинар «Использование адъювантов Montanide™ в производстве вакцин для птиц» проходил с 6 по 8 ноября 2012 г. в Дубае, ОАЭ. Эта встреча была организована SEPPIC с целью демонстрации результатов применения адъювантов в составе вакцин для птиц. SEPPIC занимается разработкой и продажей безопасных и эффективных адъювантов более 30 лет. В рамках долгосрочного сотрудничества между SEPPIC и ФГБУ «ВНИИЗЖ» Роман Яшин и Артем Спиридонов были приглашены на семинар, чтобы представить результаты испытаний вирусных вакцин для птиц с использованием адъювантов Montanide™. В семинаре приняли участие сотрудники исследовательских институтов и компаний по производству вакцин из России, Египта, Пакистана, Ирана и Турции. Были представлены результаты изучения инактивированных и живых вакцин против вирусных и бактериальных болезней птиц. Семинар способствовал развитию партнерских отношений и сотрудничеству между участниками. Эта статья дает краткую информацию о результатах исследований.

Глобальное птицеводство – является наиболее быстроразвивающимся сектором мясного производства.

С 1960 по 2010 гг. производство мяса птицы в мире возросло в 4,5 раза, в то время как производство свинины – в 2,5 раза, а производство продуктов скотоводства осталось на том же уровне. Применение антибиотиков для сохранения здоровья животных в прошлом было довольно успешным, но в связи с тем, что микробиологическая устойчивость к ним возросла, в разных регионах мира в настоящее время принята политика сокращения их использования. Следовательно, применение вакцин становится все более важным в животноводстве [6].

Живые и инактивированные вакцины для птиц широко используются в настоящее время. Использование адъювантов в инактивированных бактериальных и вирусных вакцинах является обязательным. Наиболее эффективны эмульсионные адъюванты «вода в минеральном масле» (W/O). Данные адъюванты способны вызвать длительное эффективное действие вакцин. Однако для обеспечения должной безопасности особое внимание необходимо уделять качеству поверхностно-активных соединений (сурфактантов), так же как и качеству масла [6].

Адаптированные и действенные адъюванты применяются для:

- повышения уровня и длительности защитных свойств вакцин для птиц;
- уменьшения содержания антигена в вакцине или дозе вакцины;
- выработки определенных типов иммунных ответов (гуморальный иммунитет или иммунитет, опосредованный клетками).

Адъювант Montanide™ ISA 70 VG (ISA 70), производимый SEPPIC, является безопасным адъювантом на основе минерального масла, который широко используется в птицеводстве во всем мире. В России ФГБУ

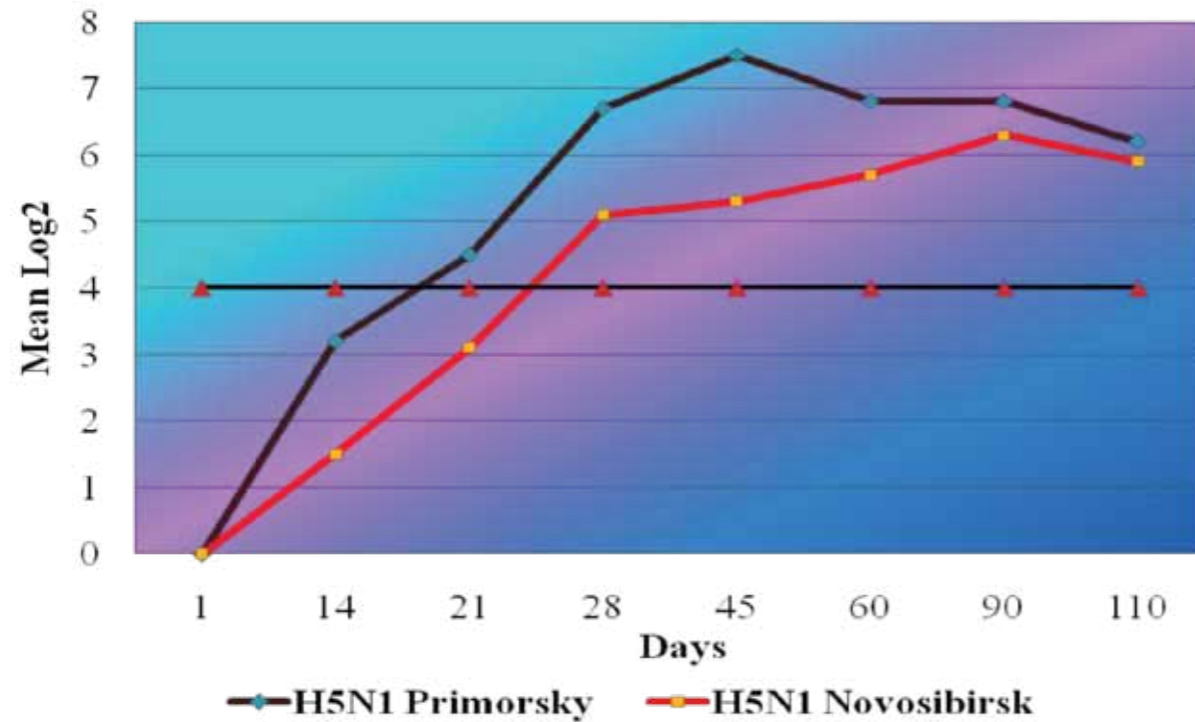


Рис. 1. Титры антител, индуцированные вакцинацией против гриппа птиц H5N1

«ВНИИЗЖ» применяет данный адъювант для производства широкого спектра инактивированных вакцин для профилактики ньюкаслской болезни, гриппа птиц, реовирусного теносиновита, метапневмовирусной инфекции птиц и других болезней кур. Так, используя ISA 70, сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ» за очень короткое время создали вакцины против высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц H5N1 «Новосибирский» и «Приморский». Эти вакцины способны индуцировать антитела в высоких титрах и обеспечивать полную защиту, без какой либо местной реакции на вакцину (рис. 1, таблица) [1, 2, 3, 4].

Тогда как адъюванты «вода в минеральном масле» до сих пор в основном использовались для усиления гуморального иммунного ответа, новые адъюванты, которые также усиливают клеточный иммунный ответ, могут повысить эффективность действия вакцин. Например, они могут способствовать продлению перекрестной защиты от различных вирусных штаммов или серотипов. Montanide™ ISA 71 VG (ISA 71) является новым адъювантом на основе минерального масла,

который был разработан для производства эмульсий «вода в минеральном масле» и специально составлен для стимуляции клеточного иммунитета. Montanide ISA 71 состоит из обогащенного легкого минерального масла и наивысшей степени очищенного эмульгатора, полученного из маннитола и олеиновой кислоты растительного происхождения [6].

Результаты сотрудничества между SEPPIC и Доктором Hyun Lillehoj из Службы сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США, показывают, что Montanide™ ISA 71 VG способен вызвать сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ в субъединичных вакцинах для профилактики кокцидиоза и некротического энтерита у цыплят. Кокцидиоз является болезнью, вызываемой внутриклеточными паразитами, и клеточный иммунный ответ является обязательным для обеспечения защиты. Другие результаты показали, что вакцинация профилином из *Eimeria acervulina* + Montanide ISA 71 VG вызывает перекрестную защиту, так как данная вакцина способна защитить кур от инфицирования как *Eimeria acervulina*, так и *Eimeria tenella* (опубликовано S.I. Jang et al., Experimental Parasitology. – 2001. Vol. 127) [6].

Также был представлен новый адъювант Montanide™ ISA 71R VG (ISA 71R). Этот адъювант был

Табл. Устойчивость кур к контрольному заражению вирулентными штаммами «Новосибирский» и «Приморский» вируса гриппа птиц через 28 сут. после иммунизации

Группа птиц	Результат патогенного действия штамма		Уровень защиты при заражении штаммом, %	
	«Новосибирский»	«Приморский»	«Новосибирский»	«Приморский»
Иммунизированы вакциной из шт. «Новосибирский»	10/10*	7/10	100	70
Иммунизированы вакциной из шт. «Приморский»	10/10	9/10	100	90
Иммунизированы вакциной из смеси штаммов «Новосибирский» и «Приморский»	10/10	10/10	100	100
Не вакцинированы (контроль)	0/10	0/10	0	0

\*количество здоровых цыплят через 6 сут. после контрольного заражения/общее количество зараженных цыплят; цыплята контрольной группы погибли через 48-72 ч после контрольного заражения.

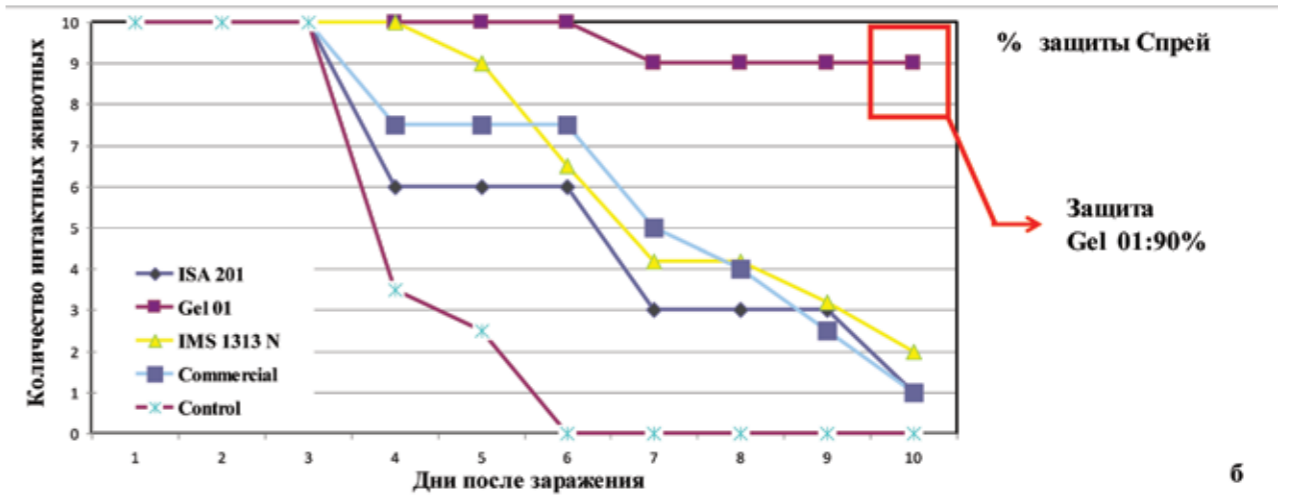
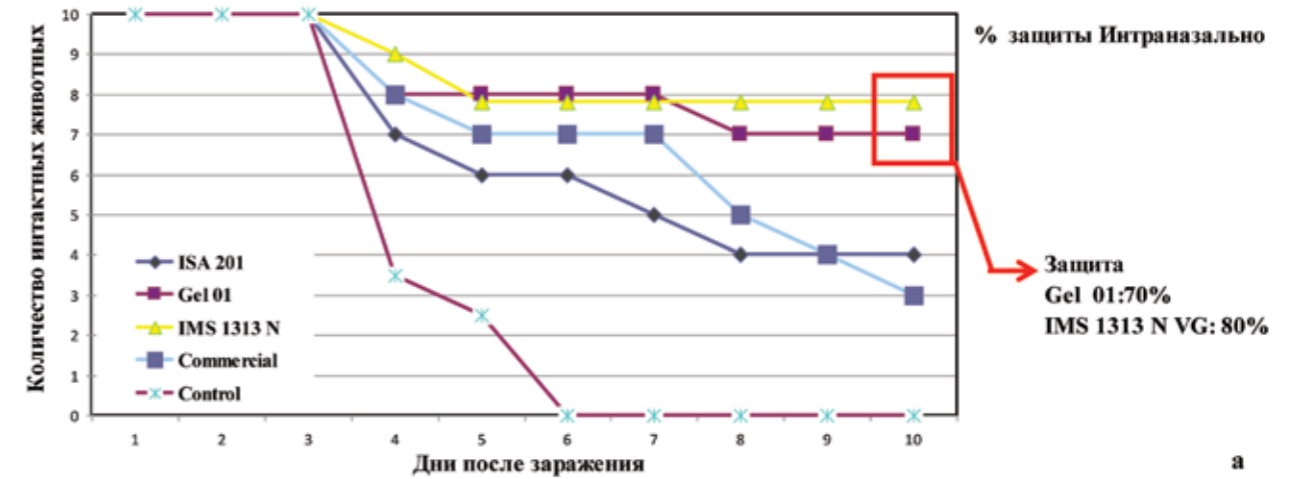


Рис. 2. Результаты контрольного заражения вирусом инфекционного бронхита птиц, вакцинированных образцами живых вакцин с использованием адъювантов Montanide™ GEL 01 или Montanide™ IMS 1313N VG

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

создан для повышения стабильности действия вакцин, составленных с использованием дестабилизирующих антигенов или вакцин, хранящихся в проблемных условиях. Montanide ISA 71R сопоставим с Montanide ISA 71 VG по безопасности и эффективности, так как он не вызывает местных реакций и стимулирует длительный иммунитет.

Другим важным вопросом, касающимся вакцинации птиц, является способ введения вакцин. Живые аттенуированные вакцины обычно вводятся методом распыления или добавляются в питьевую воду. Совместные исследования проведенные SEPPIC и ФГБУ «ВНИИЗЖ» показали, что действие живых вакцин против инфекционного бронхита (штамм H-120) и ньюкаслской болезни, введенных интраназально или путем распыления, может быть усилено добавлением адъювантов Montanide™ GEL 01 (полимерная технология) или Montanide™ IMS 1313N VG (технология наноэмульсия + иммуномодулятор) к растворителю лиофилизата живых вакцин (Рис. 2 а, б). Использование адъюванта в живой вакцине может позволить производителю снизить антигенную нагрузку вакцины и повысить ее безопасность [5].

Необходимо отметить, что выбор адъюванта для создания вакцин против болезней птиц должен быть основан на типе антигена (инактивированный, субъединичный, живой аттенуированный), типе иммунного ответа (длительный/короткий, гуморальный/клеточный), целевого животного (бройлеры, племенная птица, несушки, утки, голуби, гуси, индейки) и способе введения.

1. Изучение иммуногенной активности инактивированной вакцины против гриппа птиц / С.В. Фролов, Т.Б. Манин, А.В. Борисов [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – 2007. – Т. 5. – С. 138–143.

2. Изучение динамики иммунного ответа после применения экспериментальной вакцины против гриппа и ньюкаслской болезни птиц / А.С. Иголкин, М.А. Циванюк, Т.Б. Манин [и др.] // Вет. патология. – 2007. – № 4(23). – С. 152–154.

3. Протективные свойства вакцины против гриппа птиц / И.А. Чвала, Л.О. Щербакова, Ю.Ю. Бабин [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2010. – Т.55, № 4. – С. 40–44.

4. Сравнение протективных свойств экспериментальных инактивированных вакцин против гриппа птиц, изготовленных на основе разных штаммов вируса ВППП А/Н5N1 / В.Н. Ирза, А.В. Варкентин, С.В. Фролов [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 5. – С. 19–21.

5. Формирование гуморального иммунитета вакцинами против инфекционного бронхита кур / Д.А. Глейзер, С.В. Фролов, А.В. Борисов, Т.В. Хлыбова // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. – С. 417–424.

6. Aucouturier J., Dupuis L., Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines // J. Vaccine. – 2001. – Vol. 19. – P. 2666–2672.

# IMPORTANCE OF ADJUVANTS FOR THE DEVELOPMENT OF EFFICIENT AND SAFE AVIAN VACCINES

Juliette Ben Arous<sup>1</sup>, Laurent Dupuis<sup>2</sup>, Artem Spiridinov<sup>3</sup>, Roman Yashin<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD, Marketing and Development Engineer for Vaccine Adjuvants; SEPPIC, France

<sup>2</sup> Research and Development Director; SEPPIC, France; E-mail: laurent.dupuis@airliquide.com

<sup>3</sup> veterinarian, FGBl «ARRIAH», Vladimir; E-mail: spiridonov@arriah.ru

<sup>4</sup> leading veterinarian, FGBl «ARRIAH», Vladimir

## SUMMARY

During the «Montanide™ adjuvants for poultry vaccines» seminar held in Dubai in November 2012, researchers from SEPPIC and FGBl «ARRIAH» presented their results on the use of adjuvants for the development of avian vaccines.

**Key words:** poultry vaccines, adjuvants, Montanide, Avian influenza, Newcastle disease.

The seminar “Montanide™ adjuvants for poultry vaccines” has been held on November 6<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> 2012 in Dubai, UAE. This meeting was organized by SEPPIC to present scientific results on the use of adjuvants in avian vaccine development. SEPPIC has been developing and selling safe and efficient adjuvants for veterinary vaccines for more than 30 years. As part of the long term scientific collaboration between FGBl “ARRIAH” and SEPPIC, Roman Yashin and Artem Spiridinov were invited to present results on the development and production of viral avian vaccines using Montanide™ adjuvants. The seminar gathered participants from research institutes and vaccine companies from Russia, Egypt, Pakistan, Iran and Turkey. Results of animal trials of inactivated and live vaccines against viral, bacterial and parasitic diseases of poultry were presented. The seminar gave also opportunities to develop partnerships and collaborations between the participants. This article presents the summary of the research data that was presented during the seminar.

Global avian production is the fastest growing meat production sector. From 1960 to 2010, global production of poultry has been multiplied by 4,5, whereas swine production grew by a factor 2,5 and cattle and sheep

production was stable. Antibiotics have been successful in the past to sustain animal health, but as microbial resistance to these molecules is increasing, policies of antibiotics use reduction are appearing in diverse parts of the world. The use of vaccines will therefore become more and more important for veterinary production [6].

Live and inactivated avian vaccines are used in the field. For inactivated bacterial or viral vaccines, the use of vaccine adjuvants is mandatory. The most efficient adjuvant technologies for avian vaccines are Water in mineral Oil (W/O) emulsion adjuvants. These adjuvants are indeed strong adjuvants that induce long-term efficacy in poultry vaccines. However, it should be noted that a specific care has to be given to the quality of surfactants as well as the nature of the oil to avoid safety issues [6].

Adapted and efficient adjuvants can especially be used to:

- increase the level and duration of protection of avian vaccines;
- decrease the antigenic load in the vaccine or the vaccine dose administered to chickens;
- develop specific types of immune responses (humoral versus cell mediated immunity).

SEPPIC adjuvant Montanide™ ISA 70 VG (ISA 70) is a safe mineral oil based adjuvant that has been used extensively in poultry vaccines worldwide. In Russia, FGBl “ARRIAH” used this adjuvant to develop a large range of inactivated vaccines for chickens, against Newcastle disease, Avian Influenza, Reovirus, Metapneumovirus, and others. In particular, using ISA 70, FGBl “ARRIAH” was able to produce in a very short time avian influenza vaccines against highly pathogenic H5N1 “Novosibirsk” and “Primorsky” strains. These vaccines induce high antibody titers and full protection, without any local reactions to the vaccine (Fig. 1, Table) [1, 2, 3, 4].

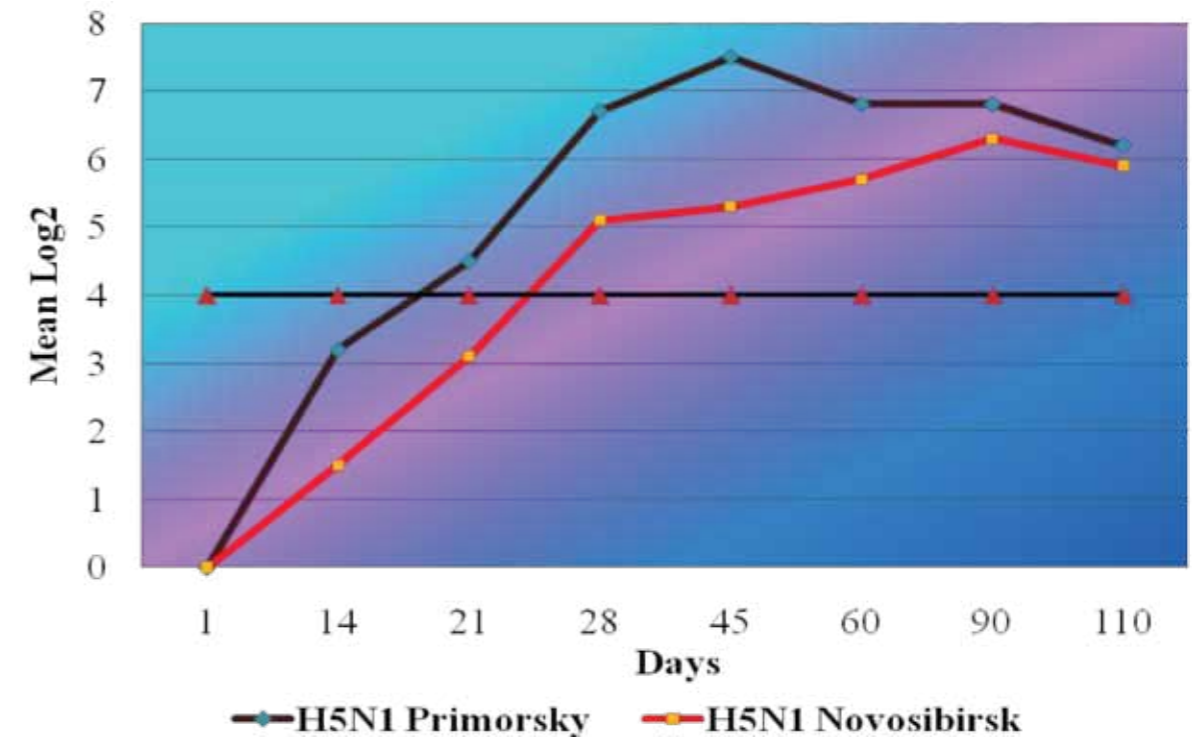


Fig 1. Antibody titers induced by H5N1 avian influenza vaccination

Whereas W/O adjuvants have until now mostly been used to increase humoral immune response, new adjuvants that also increase the cellular immune response could improve the efficacy of avian vaccines. For example, they could help to extend the vaccinal cross-protection against different viral strains or serotypes. Montanide™ ISA 71 VG (ISA 71) is a new mineral oil based adjuvant that has been developed for the manufacture of water-in-mineral oil emulsions, and that was specifically formulated to stimulate cell-mediated immunity. ISA 71 is composed of an enriched light mineral oil able to stimulate both humoral and cellular immune response, with an extremely refined emulsifier obtained from mannitol and purified oleic acid of vegetable origin [6].

The results of the collaboration between SEPPIC and Dr Hyun Lillehoj from ARS, USDA show that Montanide™ ISA 71 VG is able to induce strong humoral and cellular immune response in subunit vaccines for chickens against coccidiosis and necrotic enteritis. Coccidiosis is a intracellular parasitic disease, and cellular immune response is mandatory to confer protection. Among other results, it was shown that vaccination with profilin from *Eimeria acervulina* + ISA 71 induces cross-protection, as

this vaccine is able to protect chickens against infection by both *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* (published S.I. Jang et al., Experimental Parasitology. – 2001. Vol. 127) [6].

The new adjuvant Montanide™ ISA 71R VG (ISA 71R) was also presented. This adjuvant has been developed to increase the stability of vaccines formulated with destabilizing antigens or stored in problematic conditions. ISA 71R has a safety and efficacy profile comparable to ISA 71, as it does not induce problematic local reactions and induces long term immunity.

Another important issue for avian vaccination is the route of administration. Live attenuated vaccines are usually administered through spray vaccination or in the drinking water of the chickens. Adjuvants can also be used to improve mucosal administration of live vaccines. In a collaborative study performed by SEPPIC and FGBl “ARRIAH”, the aqueous adjuvants Montanide™ GEL 01 (polymer technology) and Montanide™ IMS 1313N VG (nanoemulsion +immunostimulant technology)

Table. Resistance of chickens to challenge with AI virulent “Novosibirsk” and “Primorsky” strains 28 days after immunization

Group of chickens	Pathogenic effect of strain:		Level of protection (%) after challenge with strain:	
	«Novosibirsk»	«Primorsky»	«Novosibirsk»	«Primorsky»
Immunized with the vaccine based on “Novosibirsk” strain	10/10*	7/10	100	70
Immunized with the vaccine based on “Primorsky” strain	10/10	10/10	100	100
Non-vaccinated (control)	0/10	0/10	0	0

Note\* – number of healthy chickens 6 days after challenge/total number of challenged chickens; chickens of control group died 48-72 hours after challenge



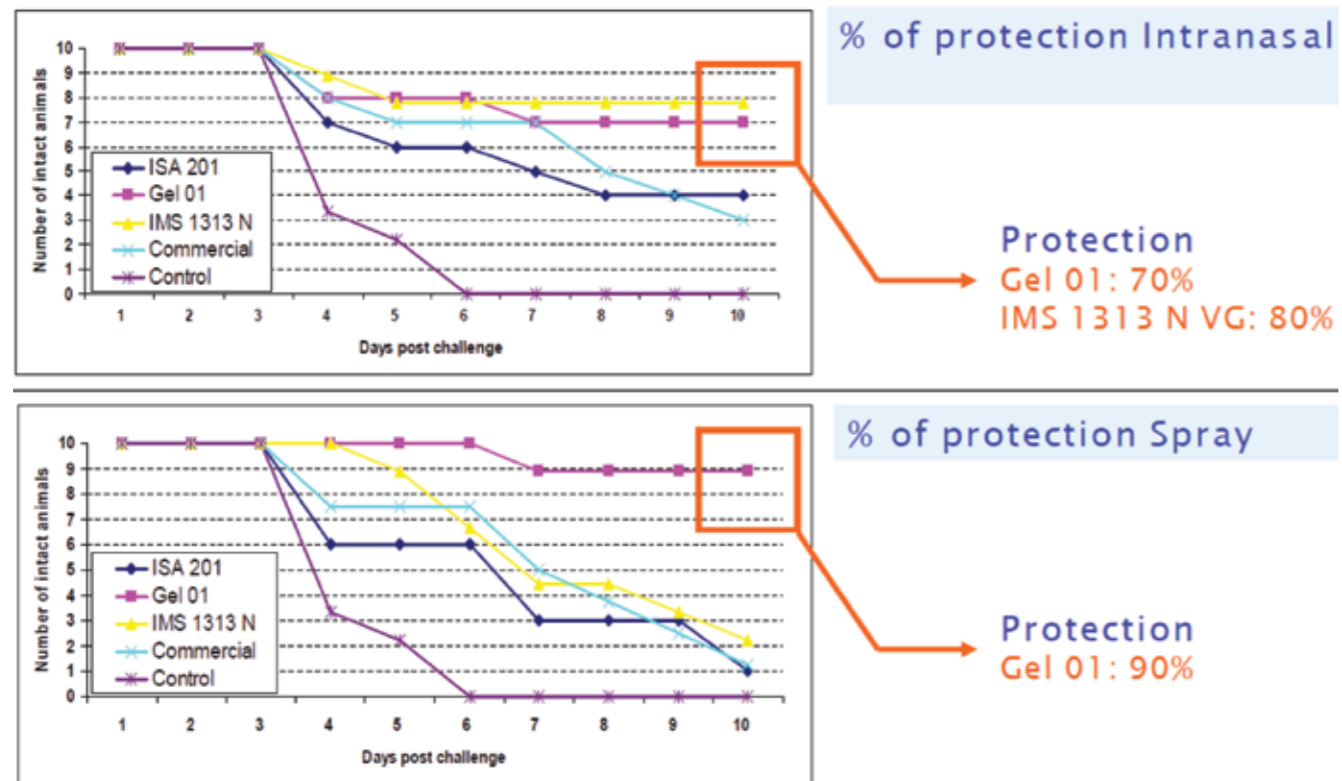


Fig. 2. Improvement of the resistance of chickens to Infectious bronchitis challenge by the addition of Montanide Gel 01 and Montanide IMS 1313N VG adjuvants in live IB vaccines

have been shown to be compatible with live vaccine strains of Newcastle disease and Infectious bronchitis viruses. These adjuvants are added to the diluents of lyophilisate live vaccines. It was shown in this study that the protection conferred by infectious bronchitis live vaccines (strain H-120) delivered intranasally or through spray administration can be improved by the addition of Montanide™ GEL 01 or Montanide™ IMS 1313N VG (Figure 2). The use of adjuvant in live vaccine could allow the vaccine producer to decrease the antigenic load in the vaccine, which could improve the safety of the vaccine [5].

Finally, it should be noted that the choice of the adjuvant for the development of avian vaccines should be based on the type of antigen (inactivated, subunit, live attenuated), the type of immune response needed (long-term/short-term, humoral/cellular...), the target animals (broilers, breeders, layers, ducks, pigeons, geese, turkeys...) and the route of administration.

## REFERENCES

1. Изучение иммуногенности инактивированной вакцины против гриппа птиц / С.В. Фролов, Т.Б. Манин, А.В. Борисов [и др.] // Тр. Федерального центра

охраны здоровья животных. – 2007. – Т. 5. – С. 138–143.

2. Изучение динамики иммунного ответа после применения экспериментальной вакцины против гриппа и ньюкаслской болезни птиц / А.С. Иголкин, М.А. Циванюк, Т.Б. Манин [и др.] // Вет. патология. – 2007. – № 4(23). – С. 152–154.

3. Протективные свойства вакцины против гриппа птиц / И.А. Чвала, Л.О. Щербакова, Ю.Ю. Бабин [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2010. – Т.55, № 4. – С. 40–44.

4. Сравнение протективных свойств экспериментальных инактивированных вакцин против гриппа птиц, изготовленных на основе разных штаммов вируса ВППП А/Н5N1 / В.Н. Ирза, А.В. Варкентин, С.В. Фролов [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 5. – С. 19–21.

5. Формирование гуморального иммунитета вакцинами против инфекционного бронхита кур / Д.А. Глейзер, С.В. Фролов, А.В. Борисов, Т.В. Хлыбова // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. – С. 417–424.

6. Aucouturier J., Dupuis L., Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines // J. Vaccine. – 2001. – Vol. 19. – P. 2666–2672.

УДК: 619:579.84:579.861.2:615.28

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ЭШЕРИХИЙ, ПАСТЕРЕЛЛ И ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИЦИДНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КОМПЛЕКСНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА ДИОКСИГЕН

А.Г. Шахов<sup>1</sup>, Л.Ю. Сашнина<sup>2</sup>, Д.В. Федосов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> заведующий отделом микробиологии, вирусологии и иммунологии, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корр. РАСХН;

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН, г. Воронеж, e-mail: nivipat@mail.ru

<sup>2</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук; ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН, г. Воронеж

<sup>3</sup> научный сотрудник; ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН, г. Воронеж

## РЕЗЮМЕ

Электронно-микроскопическими исследованиями выявлены ультраструктурные и функциональные изменения в клетках эшерихий, пастерелл и золотистого стафилококка под воздействием бактерицидных концентраций диоксигена, обусловленные синергидным эффектом составляющих его компонентов, обладающих различным механизмом действия на микробную клетку.

**Ключевые слова:** ультраструктура, эшерихии, пастереллы, золотистый стафилококк, диоксиген, синергидный эффект.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечен рост числа заболеваний человека и животных, ассоциированных с активацией эшерихий и золотистого стафилококка, быстро приобретающих множественную лекарственную устойчивость [1, 2, 4, 11]. Пастереллы различных серовариантов индуцируют многие инфекционные патологии у различных видов животных [7, 8]. У возбудителей пастереллезных инфекций также часто регистрируется устойчивость к антибиотикам [4].

Для этиотропной терапии больных животных при инфекциях, вызываемых указанными возбудителями, разрабатываются комплексные препараты, которые наряду с обеспечением высокого лечебного эффекта в значительной степени сдерживают развитие устойчивости к ним микроорганизмов [3, 5, 10]. К таким препаратам относится диоксиген, разработанный во ВНИВИПФит и НПО «Агрофарм» на основе диоксидина и гентамицина.

Цель исследования – изучить влияние комплексного препарата диоксиген на структуру и функции эшерихий, пастерелл и золотистого стафилококка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тест-культур использовали референтные штаммы *Escherichia coli* 866, *Pasteurella multocida* B14 и *Staphylococcus aureus* 209 P в фазе логарифмического роста. Препарат диоксиген вносили в 5-часовую бульонную культуру в минимальной бактерицидной и в концентрации, в 4 раза ее превышающей (4 МбцК). Время инкубации 3 часа. Контролем служили культуры без препарата. Для электронно-микроскопического исследования образцы помещали на 1 час в 2,5% глу-

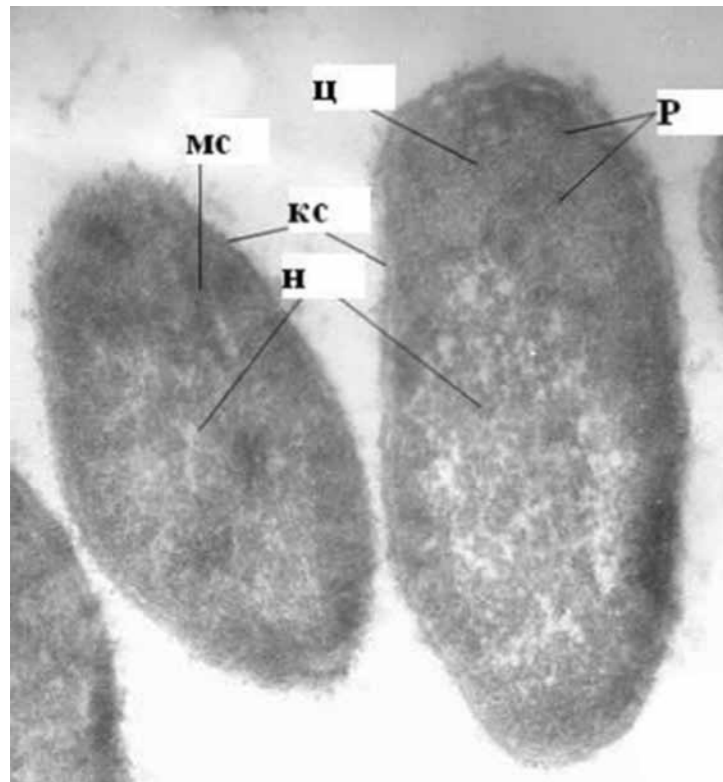


Рис. 1. Клетки эшерихий (контроль),  $\times 60000$   
КС – клеточная стенка, МС – мезосомальные структуры, Ц – цитоплазма, Р – рибосомы, Н – нуклеоид

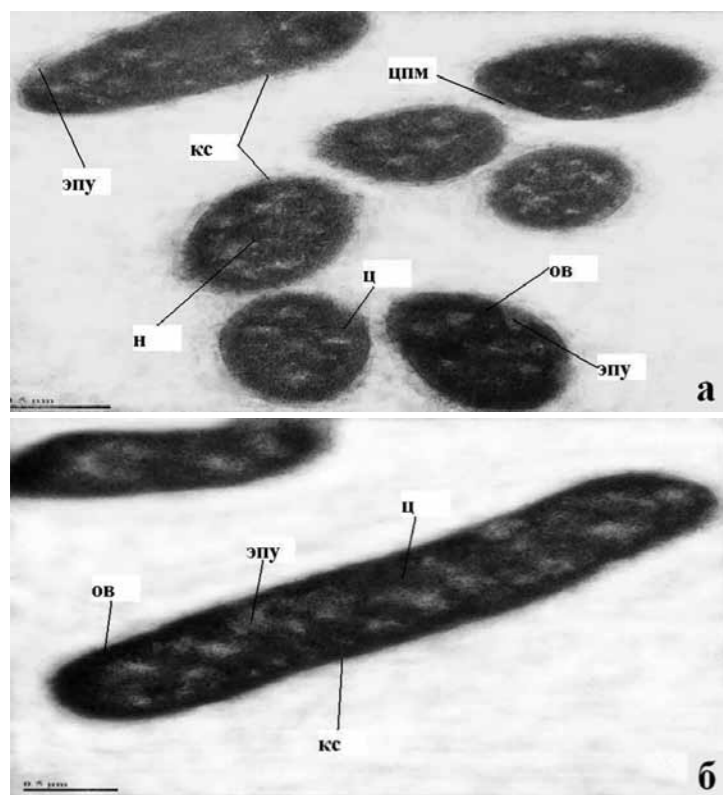


Рис. 2. (а, б). Клетки эшерихий под воздействием диоксигена (4 МБцК),  $\times 50000$   
КС – клеточная стенка, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, Ц – цитоплазма, ОВ – осмиофильные включения, ЭПУ – электронно-прозрачные участки, Н – нуклеоид

таральдегид на S-коллиндиновом буфере. После отмывания 10% раствором сахарозы проводили фиксацию четырехокисью осмия. Фиксированный материал обезжировали в возрастающих концентрациях этилового спирта и заключали в смесь эпоновых смол.

Срезы получали на ультратоме LKB III-8802A, контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 при инструментальном увеличении  $\times 50000$ – $80000$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Воздействие диоксигена на E. coli.** Исходные клетки имели свойственную эшерихиям морфологию, обладали типичной для грамотрицательных бактерий трехслойной клеточной стенкой с волнистой поверхностью, обусловленной наружным бимолекулярным липидо-протеиновым слоем.

Слои клеточной стенки, периплазматическое пространство и цитоплазматическая мембрана четко видны и дифференцированы. Последняя плотно прилегала к цитоплазме на всей ее поверхности, имела хорошую очерченность.

Цитоплазма гомогенна, нуклеоид хорошо просматривался и занимал большую часть цитоплазмы, вокруг него обнаруживали электронно-плотный слой рибосомального аппарата и мембранные структуры (рис. 1).

Под влиянием минимальной бактерицидной концентрации диоксигена клеточная стенка эшерихий теряла волнистость и четкость границ слоев. Цитоплазматическая мембрана просматривалась не на всем протяжении, на полюсах клетки происходило увеличение периплазматического пространства с образованием разреженных полостей. Цитоплазма имела неоднородную оптическую плотность, в ней обнаруживали электронно-прозрачные участки различных размеров. У значительной части эшерихий на полюсах клеток, вблизи цитоплазматической мембраны выявляли осмиофильные включения. Нуклеоид слабо дифференцировался, в отдельных местах сливался с цитоплазмой, в нем выявляли электронно-прозрачные участки. Рибосомальный комплекс и мезосомальные структуры не обнаруживали (рис. 2 а, б).

Высокая концентрация препарата (4 МБцК) вызвала более выраженную деструкцию эшерихий. Клеточная стенка истончалась, слои ее не дифференцировались, на отдельных участках происходило разрыхление наружного плотного слоя с выходом содержимого из клетки. Цитоплазматическую мембрану не обнаруживали. Цитоплазма и нуклеоид не дифференцировались.

Содержимое клеток приобретало гомогенный вид и имело неоднородную электронную плотность. В нем выявляли электронно-прозрачные зоны лизиса различных размеров и конфигураций. Осмиофильные включения увеличивались в размерах, их обнаруживали по периферии и внутри клеток. Рибосомально-белковый комплекс и мембранные структуры не выявляли (рис. 3 а, б).

**Воздействие диоксигена на Pasteurella multocida.** Клетки пастерелл (контроль) имели складчатую неровную поверхность, образованную трехслойной клеточной стенкой, отделенной периплазмой от более гладкой цитоплазматической мембраны.

Цитоплазма гомогенная, заполнена электронно-плотным гранулярным компонентом. Рибосомальный

аппарат выражен. Нуклеоид занимал значительную центральную часть клетки и был представлен рыхлой осмиофильной структурой (рис. 4).

При воздействии минимальной бактерицидной концентрации диоксигена пастереллы принимали вытянутую, овальную или неправильную форму. Трехслойную структуру клеточной стенки обнаруживали не на всем протяжении, на отдельных ее участках на поверхности выявляли рыхлый материал, который представлял часть наружного слоя. Цитоплазматическая мембрана дифференцировалась не на всем протяжении, в местах повреждения клеточной стенки ее не обнаруживали. Цитоплазма имела неоднородную электронно-оптическую плотность. В ней располагались разреженные участки средней электронной плотности. Нуклеоид дифференцировался слабо, в нем обнаруживали обширные электронно-прозрачные зоны с мелкой зернистостью. Рибосомальный аппарат и мезосомальные структуры не выявляли (рис. 5 а, б).

Под действием 4 МБцК препарата большинство пастерелл принимало неправильную форму. Клеточная стенка их истончалась, ее слои не дифференцировались и выявлялись лишь на отдельных участках. Цитоплазматическую мембрану не обнаруживали. Цитоплазма была представлена электронно-плотным мелкозернистым компонентом. В ней обнаруживали электронно-прозрачные зоны лизиса различных размеров и конфигураций, располагающиеся в местах наибольшего повреждения клеточной стенки.

Большинство клеток подвергалось лизису. В цитоплазме образовывались обширные электронно-прозрачные полости. Цитоплазматический материал сокращался и был локализован по периферии клеток. На месте нуклеоида выявляли электронно-прозрачный слой. В отдельных клетках в просветленных участках обнаруживали осмиофильные включения (рис. 6 а, б).

**Воздействие диоксигена на Staphylococcus aureus.** Клетки исходного штамма имели типичную для золотистого стафилококка морфологию, обладали свойственной грамположительным микроорганизмам клеточной стенкой с гладкой поверхностью и выраженным внутренним электронно-плотным слоем. Цитоплазматическая мембрана представляла собой одноконтурную структуру, плотно прилегающую к клеточной стенке.

Цитоплазма заполнена мелкогранулярным компонентом, в отдельных участках выявляли рибосомальные гранулы. Ядерный материал, представляющий собой образование меньшей электронной плотности, локализовался в центре клетки и обнаруживался в виде светлых зон. Внутрицитоплазматические мезосомальные структуры имели вид двухконтурных мембран (рис. 7).

При воздействии диоксигена в минимальной бактерицидной концентрации клетки незначительно увеличивались, происходило набухание внутреннего плотного слоя клеточной стенки и несимметричное ее утолщение. На отдельных ее участках отмечали разрыхление наружного слоя (рис. 8 а).

Цитоплазматическая мембрана выявлялась не на всем протяжении и просматривалась как одноконтурная структура. В местах изменений клеточной стенки ее не обнаруживали (рис. 8 а, б). Цитоплазма имела различную электронно-оптическую плотность. На участках утолщения клеточной стенки и расплавления цитоплазматической мембраны в ней выявляли зоны

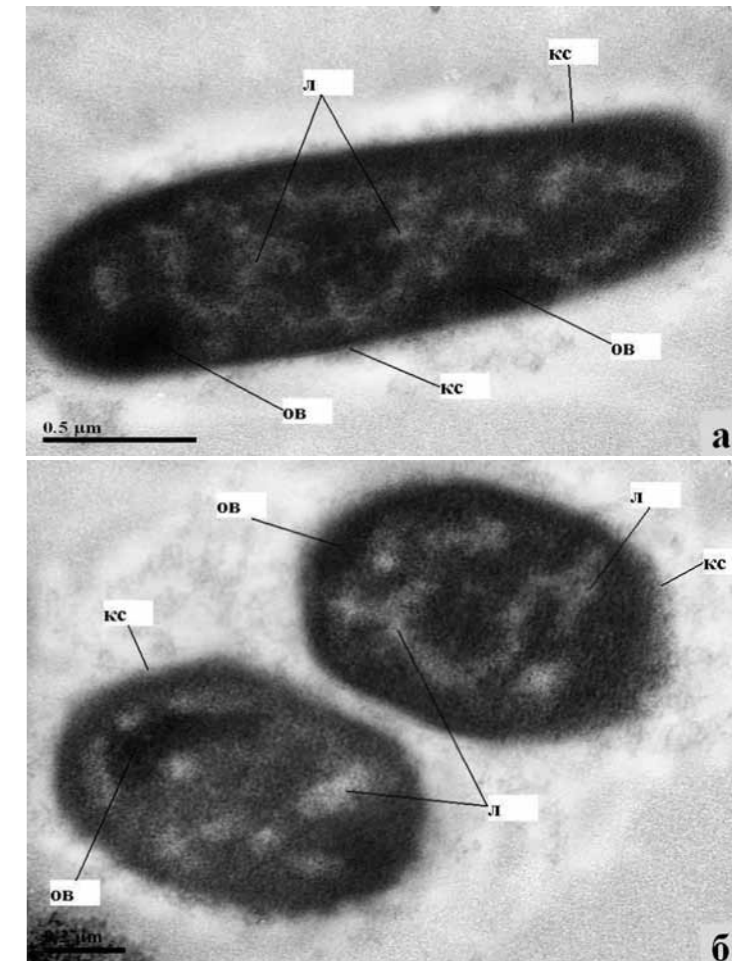


Рис. 3. (а, б). Клетки эшерихий под воздействием диоксигена (4 МБцК),  $\times 80000$   
КС – клеточная стенка, Л – зоны лизиса, ОВ – осмиофильные включения

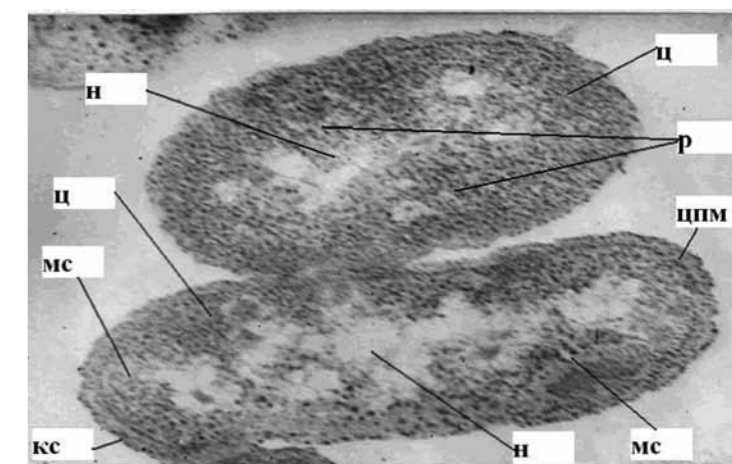


Рис. 4. Клетки пастерелл (контроль),  $\times 60000$   
КС – клеточная стенка, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, МС – мезосомальные структуры, Ц – цитоплазма, Р – рибосомы, Н – нуклеоид

с меньшей электронной плотностью. Мезосомальные структуры в виде плотных образований локализовались у цитоплазматической мембраны. Ядерный материал не дифференцировался. Рибосомальный аппарат не выявляли (рис. 8 а, б).

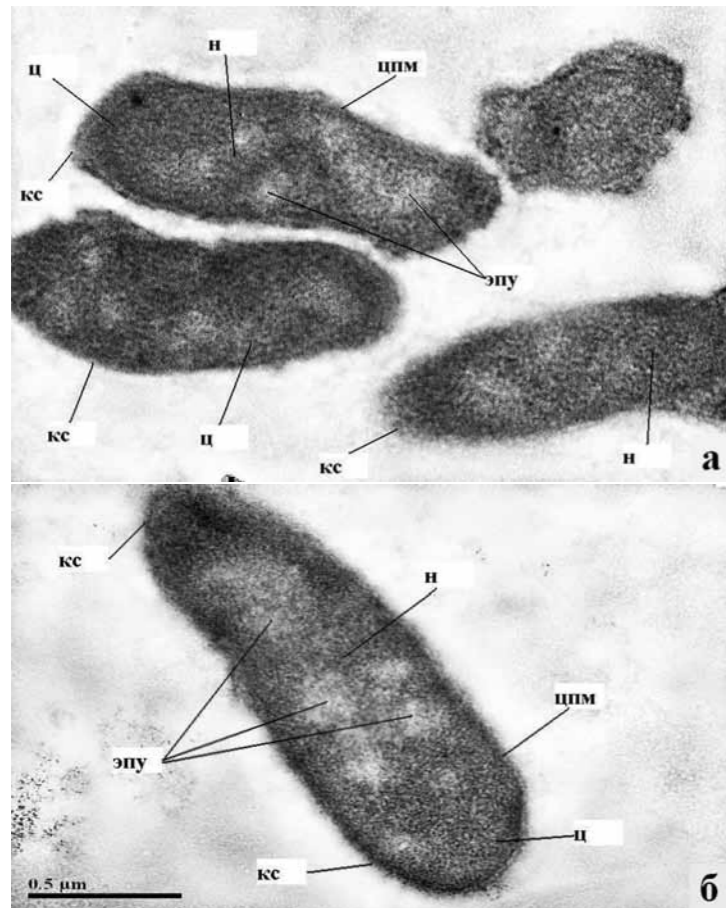


Рис.5. (а, б). Клетки пастерелл под воздействием диоксигена (МБцК),  $\times 50000$   
 КС – клеточная стенка, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, Ц – цитоплазма, ЭПУ – электронно-прозрачные участки, Н – нуклеоид

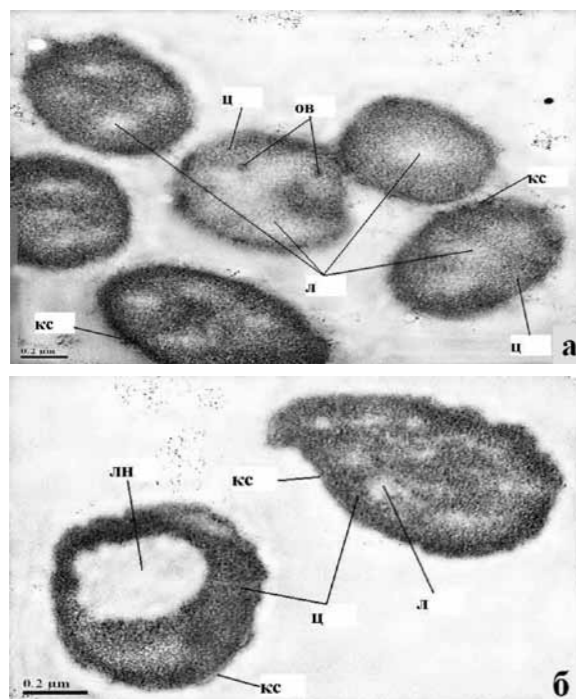


Рис.6. (а, б). Клетки пастерелл под воздействием диоксигена (4 МБцК),  $\times 50000$   
 КС – клеточная стенка, Ц – цитоплазма, Л – лизис, ЛН – лизис нуклеоида, ОВ – осмиофильные включения

При воздействии более высокой концентрации диоксигена (4 МБцК) клеточная стенка истончалась, приобретала волнистую форму и имела меньшую, чем в контроле электронную плотность. Ее наружный слой терял электронно-оптическую плотность на всем протяжении. Внутренний плотный слой выявляли на отдельных участках (рис. 9 а, б). У значительной части клеток стенка подвергалась лизису, была фрагментирована или исчезала полностью (рис. 9 б).

Цитоплазматическую мембрану не выявляли. Цитоплазма была гомогенной, электронно-плотной, в ней обнаруживали осмиофильные участки различных размеров (рис. 9 а, б). Рибосомальные структуры и нуклеоид не дифференцировались. Мезосомальные структуры в большинстве клеток отсутствовали. В отдельных случаях их обнаруживали в виде кольцевидных образований около сохранившегося внутреннего слоя клеточной стенки.

У отдельных клеток в цитоплазме на местах расплавления внутреннего слоя клеточной стенки обнаруживали обширные участки лизиса. Электронно-прозрачные участки различной плотности и конфигурации располагались в зоне цитоплазматической мембраны и нуклеоида.

Выявленные изменения в ультраструктуре бактерий под действием диоксигена обусловлены синергидным эффектом диоксида и гентамицина. Диоксидин относится к производным ди-N-окси хиноксалина и характеризуется высокими реакционными свойствами, повышенной способностью к поляризации и окислительно-восстановительным реакциям, что связано с наличием в молекуле двух групп NO. Бактерицидное действие препарата обусловлено повреждением биосинтеза ДНК микробной клетки, нарушением процессов ее деления и развитием необратимых структурных изменений в нуклеоиде и цитоплазме [6].

Помимо взаимодействия с генетическим аппаратом микробной клетки диоксидин за счет своих реакционных способностей может влиять непосредственно на клеточную стенку. Входящие в ее состав полиненасыщенные липиды теряют двойные связи, в результате чего нарушается компактность, и она становится более текучей и проницаемой для больших молекул. Наличие двух NO групп в молекуле диоксида способствует повышению его активности в анаэробных условиях за счет активации свободнорадикальных процессов и образования активных форм кислорода.

Гентамицин относится к классу аминогликозидов. Он активно проникает через клеточную мембрану, необратимо связывается с белками специфических рецепторов на субъединице 30S бактериальных рибосом и нарушает образование комплекса между информационной РНК и субъединицей 30S. Происходит ошибочное считывание ДНК, что ведет к образованию неполноценных белков, расщеплению полирибосом, нарушению синтеза белка микробной клеткой. В результате ускоряется транспорт гентамицина, приводящий к усиленному разрушению цитоплазматической мембраны микробной клетки и ее гибели [2, 6, 9].

При применении диоксида синергидный эффект компонентов обусловлен совместным действием диоксида и гентамицина на генетический аппарат и клеточную стенку микробной клетки в разных точках приложения.

Выявленное у эшерихий и пастерелл истончение клеточной стенки и разрушение ее наружного слоя являются следствием отщепления липополисахаридов и окисления фосфолипидов под действием диок-

сидина. При этом у стафилококка его воздействие на липидный участок липотейхоевой кислоты приводило к потере вертикальной структурной жесткости и утолщению клеточной стенки.

Отмеченные участки частичного лизиса цитоплазматической мембраны у всех бактерий обусловлены тем, что положительно заряженный гентамицин связывается с аминокислотами белков мембраны, в результате чего происходит разрыв и выход в межклеточное пространство ионов  $K^+$ , аминокислот, оснований и белков. Диоксидин, потенцируя свободно-радикальные процессы, способствует образованию активных форм кислорода, которые действуют на липиды цитоплазматической мембраны, нарушая ее стабильность и проницаемость.

Появление электронно-прозрачных участков в цитоплазме клеток свидетельствуют о выходе водорастворимых низкомолекулярных компонентов и увеличении гидратации клетки. Кроме того, снижение концентрации ионов  $K^+$  приводит к потере постоянного осмотического давления внутри клетки и нарушению включения неорганического фосфора в структурные компоненты и образования макроэргических фосфорных соединений (АТФ).

Выявленные изменения в зоне нуклеоида обусловлены непосредственным воздействием диоксида на структуру ДНК. Происходит удлинение нуклеиновой кислоты, разрушение фосфорных мостиков между цепями, локальное раскручивание спиралей и разрывы связей между основаниями в зонах суперспирализации бактериальной хромосомы.

При 4-кратном увеличении минимальной бактерицидной концентрации клеточная стенка у эшерихий и пастерелл расплавлялась практически на всей их поверхности за счет полного окисления липидного слоя. У стафилококков она сохранялась из-за наличия большого количества слоев пептидогликана. Цитоплазматическая мембрана разрушалась полностью.

Выявленные в клетках эшерихий и пастерелл обширные участки лизиса являются следствием значительной потери цитоплазмы жизненно важных метаболитов (аминокислоты, основания, белки), повышенной гидратацией, растворением ее компонентов в избытке воды. Выраженные в меньшей степени указанные изменения у стафилококков связаны с частичным сохранением клеточной стенки.

Лизис нуклеоида, отмеченный у всех микроорганизмов, связан с глубокими деструктивными изменениями в ДНК, вызванными диоксином, подавлением синтеза белка гентамицином, недостатком нуклеотидов, неорганического фосфора и высокоэнергетических фосфорных соединений, нарушающими процессы репарации поврежденной и синтеза новой молекулы нуклеиновой кислоты.

## Выводы

Таким образом, отмеченные ультраструктурные и функциональные изменения в клетках эшерихий, пастерелл и золотистого стафилококка под действием бактерицидных концентраций диоксида обусловлены синергидным эффектом составляющих его активных веществ, обладающих различным механизмом действия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бриан Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.

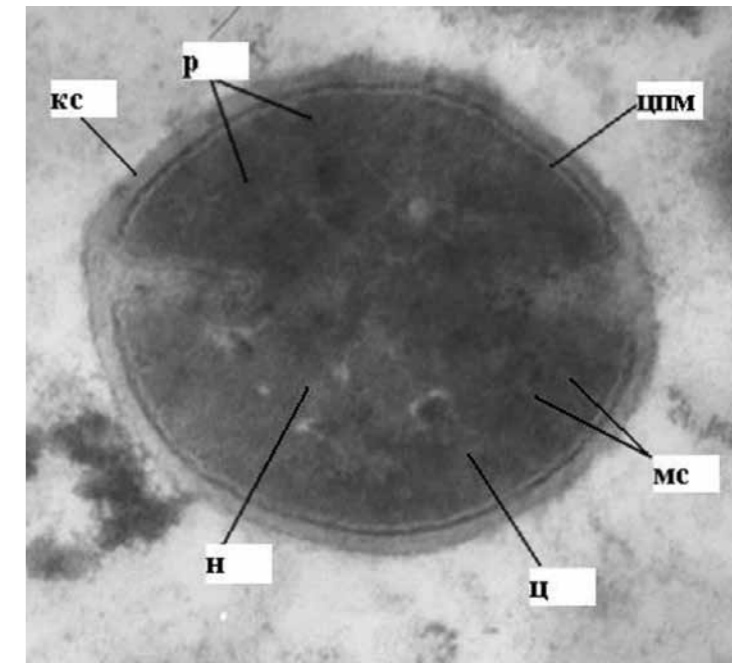


Рис.7. (а, б). Клетка золотистого стафилококка (контроль),  $\times 60000$   
 КС – клеточная стенка, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, Р – рибосомы, МС – мезосомальные структуры, Ц – цитоплазма, Н – нуклеоид

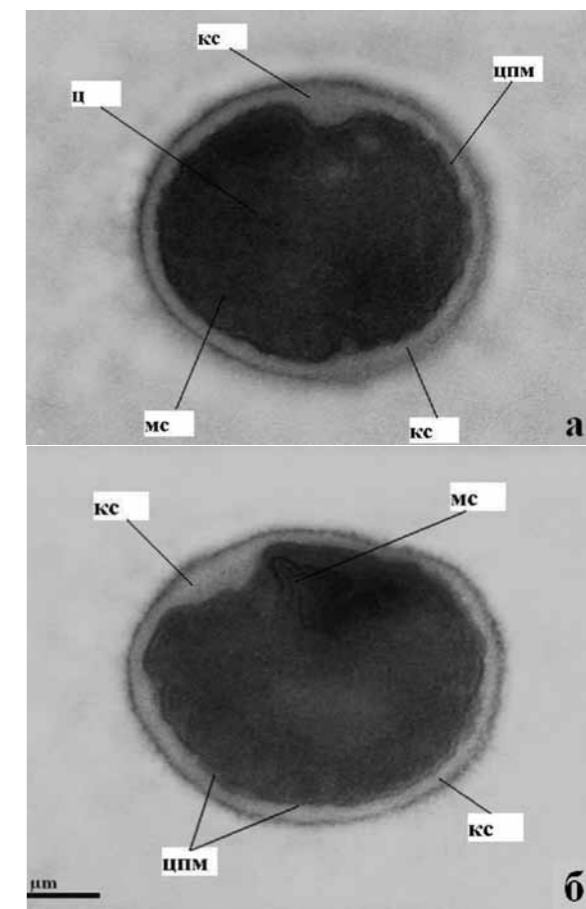


Рис.8. (а, б). Клетка золотистого стафилококка под воздействием диоксида (МБцК),  $\times 60000$   
 КС – клеточная стенка, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, МС – мезосомальные структуры, Ц – цитоплазма

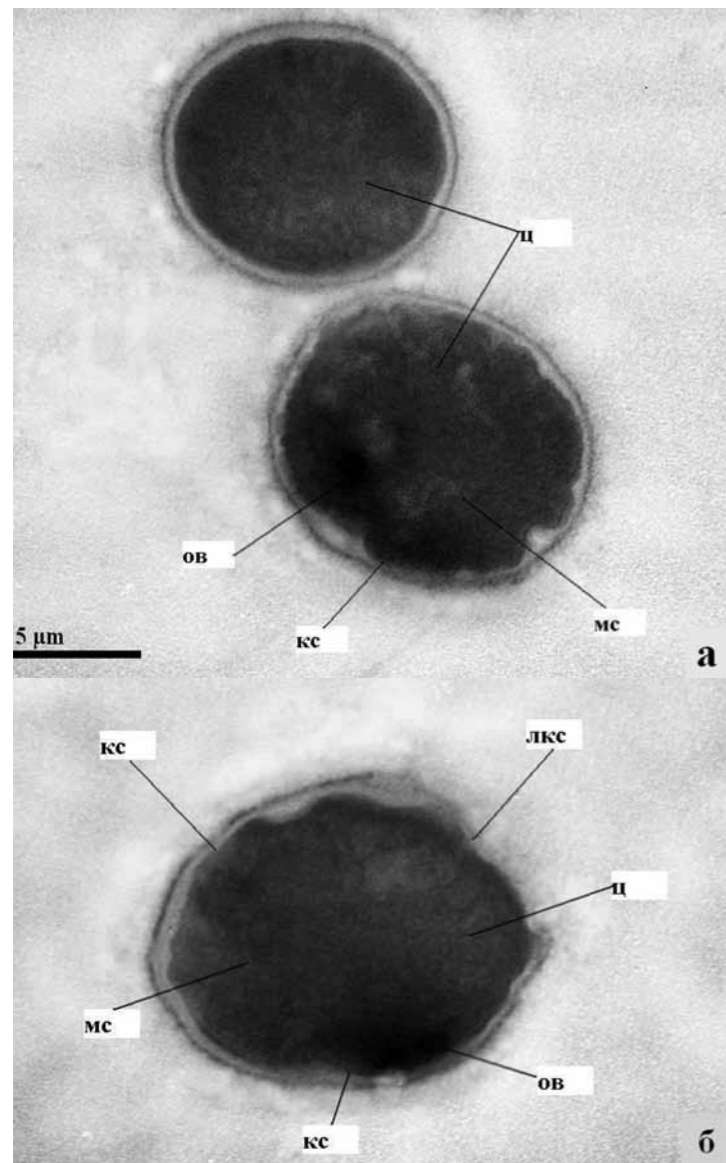


Рис. 9. (а, б). Клетки золотистого стафилококка под воздействием диоксигена (4 МБцК), 9 а –  $\times 50000$ , 9 б –  $\times 60000$   
 КС – клеточная стенка, ЛКС – лизис клеточной стенки,  
 Ц – цитоплазма, МС – мезосомальные структуры,  
 ОВ – осмиофильные включения

2. Горбенко А.В. Антибиотикорезистентность  $\beta$ -гемолитических штаммов *E. coli* – возбудителя коли-энтеротоксемии поросят // Ветеринарная медицина. – 2004. – № 83. – С. 59–62.

3. Зуев Н.П., Шахов А.Г., Буханов В.Д. Разработка антимикробных композиций на основе тилозинсодержащих препаратов и изучение их профилактической и лечебной эффективности при желудочно-кишечных и респираторных болезнях животных бактериальной этиологии // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: матер. Междунар науч.-практ. конф., Воронеж, 17–19 сентября 2008 г. – Воронеж: Истоки, 2008. – С. 137–142.

4. Исследования резистентности бактериальных возбудителей желудочно-кишечных, респираторных болезней поросят к антимикробным препаратам / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, М.И. Лебедев, Е.В. Лебедева // Доклады РАСХН. – 2011. – № 2. – С. 53–55.

5. Лагуткин Н.А. Химиотерапия при инфекционных болезнях // Ветеринария. – 2006. – № 2. – С. 24–28.

6. Машковский М.Д. Лекарственные средства: справочник. – 15-е изд., доп. – М., 2004. – 1152 с.

7. Прунтова О.В. Особенности лабораторной диагностики болезней животных, вызываемых *Pasteurella multocida* // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных: матер. Междунар. науч. конф. «Инфекционная патология животных», посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир: ООО «Транзит- ИКС», 2008. – Т. 6. – С. 229–243.

8. Сосницкий А.М., Стегний Б.Т., Апатенко В.М. Пастереллезные инфекции факторного и классического типа в составе паразитоценоза телят и поросят // Ветеринарный консультант. – 2007. – № 13 (152). – С. 15–20.

9. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. – М.: Мир, 1984. – 240 с.

10. Шабунин С.В. Лечебная эффективность комплексных препаратов на основе колистина при желудочно-кишечных болезнях телят // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: матер. Междунар. науч.-практ. конф., Воронеж, 17–19 сентября 2008 г. – Воронеж: Истоки, 2008. – С. 13–16.

11. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.

UDC: 619:579.84:579.861.2:615.28

## MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN ESCHERICHIA, PASTEURELLA AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCED BY BACTERICIDAL CONCENTRATIONS OF COMPLEX ANTIMICROBIAL DRUG DIOXIGENUM

A.G. Shakhov<sup>1</sup>, L.Yu. Sashmina<sup>2</sup>, D.V. Fedosov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Head of the Department for Microbiology, Virology and Immunology, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Agricultural Sciences; GSI All-Russian Scientific and Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh

<sup>2</sup>Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), GSI All-Russian Scientific and Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh

<sup>3</sup>Researcher, GSI All-Russian Scientific and Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh

### SUMMARY

Ultrastructural and functional changes in the cells of *Escherichia*, *Pasteurella* and *Staphylococcus aureus* induced by Dioxigenum bactericidal concentrations associated with synergistic effect of its components which have different action mechanisms on microbial cells were detected using electronic microscopy.

**Key words:** ultrastructure, *Escherichia*, *Pasteurella*, *Staphylococcus aureus*, dioxigenum, synergistic effect.

### INTRODUCTION

The increase in number of cases both in humans and animals associated with the activation of *Escherichia* and *Staphylococcus aureus* rapidly acquiring drug resistance has been registered in recent years [1, 2, 4, 11]. *Pasteurella* of different serovariants induce many infectious pathologies in different animal species [7, 8]. Antimicrobial resistance is also often noted in *Pasteurella* infection agents [4].

Complex drugs providing high curative effect as well as restricting the resistance development in microorganisms are developed for casual treatment of animals affected by

the infections caused by the abovementioned agents [3, 5, 10]. Such preparations include Dioxigenum developed in the VNIVIPFIT and Scientific Development and Production Center «Agropharm» based on dioxidine and gentamycin.

The aim of the research is to study the effect of complex drug Dioxigenum on the structure and functions of *Escherichia*, *Pasteurella* and *Staphylococcus aureus*.

### MATERIALS AND METHODS

Reference strains of *Escherichia coli* 866, *Pasteurella multocida* B14 and *Staphylococcus aureus* 209 P in log growth phase were used as test cultures. Dioxigenum was added to 5-hour broth at a minimal bactericidal concentration and at a 4-fold minimal bactericidal concentration (4 MBC). Incubation period was 3 hours. Cultures not exposed to the drug were used as controls. The samples were immersed into 2.5% glutaraldehyde in S-collidine buffer for 1 hour to perform electronic microscopy. Following the washing of the samples with 10% sucrose solution they were fixed in osmium tetroxide. Fixed material was dehydrated with increasing ethanol concentrations and was embedded into the mixture of Epon resins.

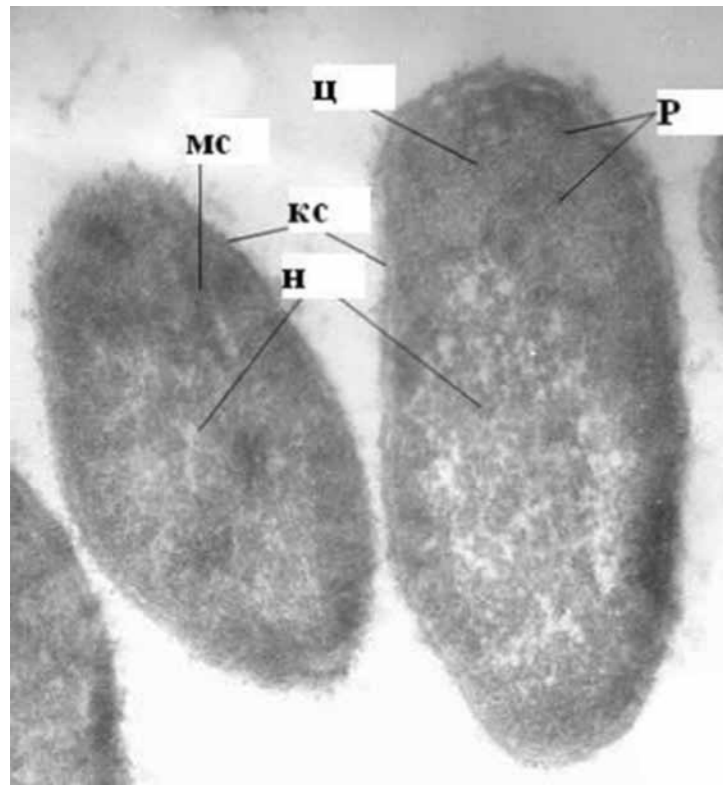


Fig. 1. *Escherichia* cells (controls), x60000  
CW – cell wall, MS – mesosome structure,  
C – cytoplasm, R – ribosomes, N – nucleoid

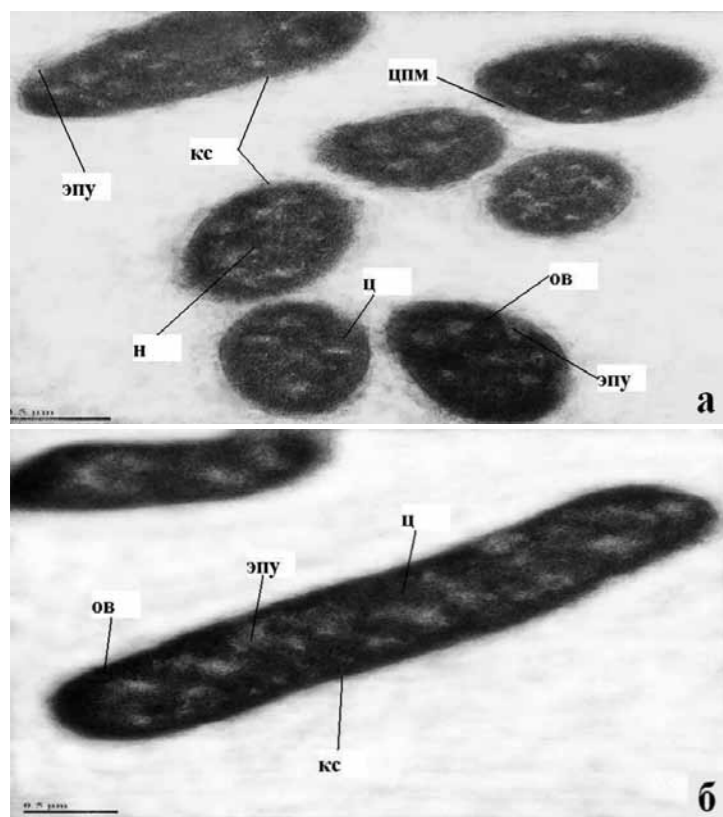


Fig. 2 (a, b). *Escherichia* cells treated with Dioxigenum (4 MBC), x50000  
CW – cell wall, CPM – cytoplasmic membrane,  
C – cytoplasm, OI – osmiophilic inclusions,  
ETZ – electron transparent zones, N – nucleoid

Thin sections were obtained using ultratome LKB III-8802A, counterstained with uranyl acetate and lead citrate and studied using electronic microscope JEM-100 at x50000-80000 magnification.

### RESULTS AND DISCUSSION

*Effects of Dioxigenum on E. coli.* Original cells had an *Escherichia*-specific morphology and three-layer cell walls with wavy surface due to an outer biological and molecular lipoprotein layer.

Cell wall layers, periplasmic space and cytoplasmic membrane were clearly visible and differentiated. The cytoplasmic membrane was closely attached to the cytoplasm over the entire surface and was well-defined.

Cytoplasm was homogeneous, nucleoid was clearly observable and covered the most part of cytoplasm; electron-dense layer of ribosomal apparatus and membrane structures were seen around the nucleoid (Fig.1).

*Escherichia* cell walls lost their waviness and sharpness of layer edges influenced by the Dioxigenum minimal bactericidal concentration. Cytoplasmic membrane was not visible everywhere, periplasmic space was enlarged; less optical dense areas in the cellular poles formed. Cytoplasm had a non-homogenous optical density; electron transparent zones of different sizes were observed in it. Osmiophilic inclusions were found in the majority of *Escherichia* cellular poles in the proximity to cytoplasmic membrane. Nucleoid was poorly differentiated, in several places it melted into cytoplasm and electron transparent zones were found in it. Ribosomal complex and mesosome structures were not found (Fig. 2 a, b).

High concentration of the preparation (4 MBC) induced a more prominent destruction of *Escherichia*. The cell wall thinned, its layers were not differentiated, outer dense layer loosened in certain regions letting the cell contents escape. Cytoplasmic membrane was not found. Cytoplasm and nucleoid were not differentiated.

The cell contents took a homogeneous form and had a non-uniform electron density. Electron transparent lysis zones of different size and configurations were found in it. Osmiophilic inclusions were enlarged; they were observed in the periphery and inside the cells. Ribosomal protein complex and membrane structures were not found (Fig. 3 a, b).

*Effects of Dioxigenum on Pasteurella multocida.* *Pasteurella* cells (controls) had a folded and wrinkled surface formed by three-layer wall separated by periplasm from a smoother cytoplasmic membrane.

Cytoplasm was homogenous, filled with electron dense granular component. Ribosomal apparatus was well-defined. Nucleoid covered the significant part of the cell center and represented a loose osmiophobic structure (Fig. 4).

Following the exposure to minimal bactericidal concentration of Dioxigenum *Pasteurella* took an elongated, oval or irregular shape. Three-layer structure of cell wall was not visualized everywhere, in several surface regions loose material presenting the part of an outer layer was observed. Cytoplasmic membrane was not differentiated everywhere; it was not found in the regions of cell wall lesion. Cytoplasm had a non-uniform electron density. Nucleoid was poorly differentiated; vast electron transparent fine stippled zones were seen in it. Ribosomal apparatus and mesosome structures were not observed (Fig. 5 a, b).

Following the treatment with 4 MBC of Dioxigenum the majority of *Pasteurella* took the irregular shape. The

cell walls thinned, their layers were not differentiated and were seen only in some regions. Cytoplasmic membrane was not observed. Cytoplasm was represented by a fine stippled electron dense component. Electron transparent lysis zones of different size and shape located in the regions of the worst cell wall lesions were visualized in it.

The majority of cells were lysed. Vast electron transparent areas were formed in cytoplasm. Cytoplasmic material shrank and was localized along the cell periphery. Electron transparent layer was observed in the place of nucleoid. In several cells in lighter areas osmiophilic inclusions were seen (Fig. 6 a, b).

*Effects of Dioxigenum on Staphylococcus aureus.* Original strain cells had *Staphylococcus aureus* – typical morphology and smooth cell wall and well-defined inner electron dense layer specific for Gram positive microorganisms. Cytoplasmic membrane looked like a single contour structure, closely attached to the cell wall.

Cytoplasm was filled with fine granular component; in some regions ribosomal granules were observed. Nuclear material looking like a formation of less electron density was located in the cell center and was visualized as light zones. Internal cytoplasmic mesosome structures looked like two-contour membranes (Fig. 7).

Following the treatment with minimal bactericidal concentration of Dioxigenum the cells enlarged moderately; inner dense layer of the cell wall swelled and thickened non-symmetrically. Outer layer loosened in some of its parts (Fig. 8a).

Cytoplasmic membrane was not observed everywhere and looked like one contour structure. It was not seen in the regions of cell wall modifications (Fig. 8 a, b). Optical density of cytoplasm was different. At the sites of cell wall swelling and cytoplasmic membrane fusion zones of less electron density were observed. Mesosome structures were concentrated near the cytoplasmic membrane in the shape of dense formations. Nuclear material was not seen. Ribosomal apparatus was not detected (Fig. 8 a, b).

Following the exposure to a higher Dioxigenum concentration (4 MBC) the cell wall thinned, became wavy and less electron-dense than the control. Its outer layer lost electron optical density all over the surface. Inner dense layer was observed in several regions (Fig. 9 a, b). The walls of a significant number of cells were lysed, fragmented or totally disappeared (Fig. 9 b).

Cytoplasmic membrane was not detected. Cytoplasm was homogenous and electron-dense; osmiophilic regions of various sizes were observed in it (Fig. 9 a, b). Ribosomal structures and nucleoid were not differentiated. Mesosome structures in most cells were absent. In some cases they looked like ring-shaped formations near the remained inner layer of the cell wall.

Vast lysis areas were observed in several cells in cytoplasm in the regions of cell wall inner layer fusion. Electron transparent regions with different density and shape were located in the zone of cytoplasmic membrane and nucleoid.

Detected modifications in bacteria ultrastructure induced by Dioxigenum action are explained by dioxidine and gentamicin synergistic effect. Dioxidine belongs to quinoxaline di-N-oxides and is characterized by high reactivity, increased polarization and oxidation-reduction abilities, which is associated with the presence of two NO groups in the molecule. Bactericidal action of the drug induces DNA synthesis disruption in the microbial cell, mitosis dysfunction and irreversible modifications in nucleoid and cytoplasm [6].

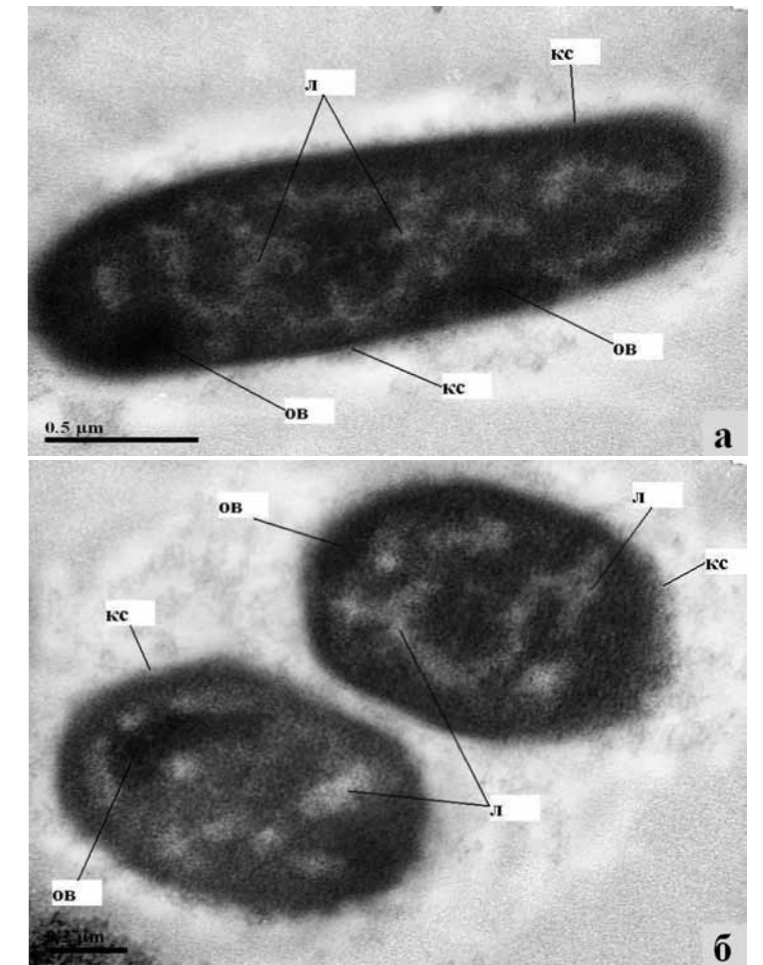


Fig. 3 (a, b). *Escherichia* cells treated with Dioxigenum (4 MBC), x80000  
CW – cell wall, L – lysis,  
OI – osmiophilic inclusions

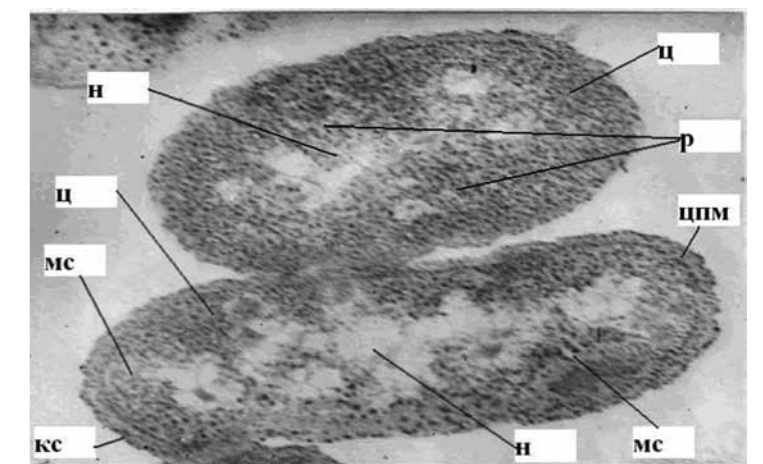


Fig. 4. *Pasteurella* cells (controls), x60000  
CW – cell wall, CPM – cytoplasmic membrane,  
MS – mesosome structure, C – cytoplasm,  
R – ribosomes, N – nucleoid

In addition to interaction with microbial cell genetic apparatus dioxidine can influence the cell wall directly by means of its reactivity. Polyunsaturated lipids forming the part of the cell wall lose their double links and their tightness disrupts, they become more viscous

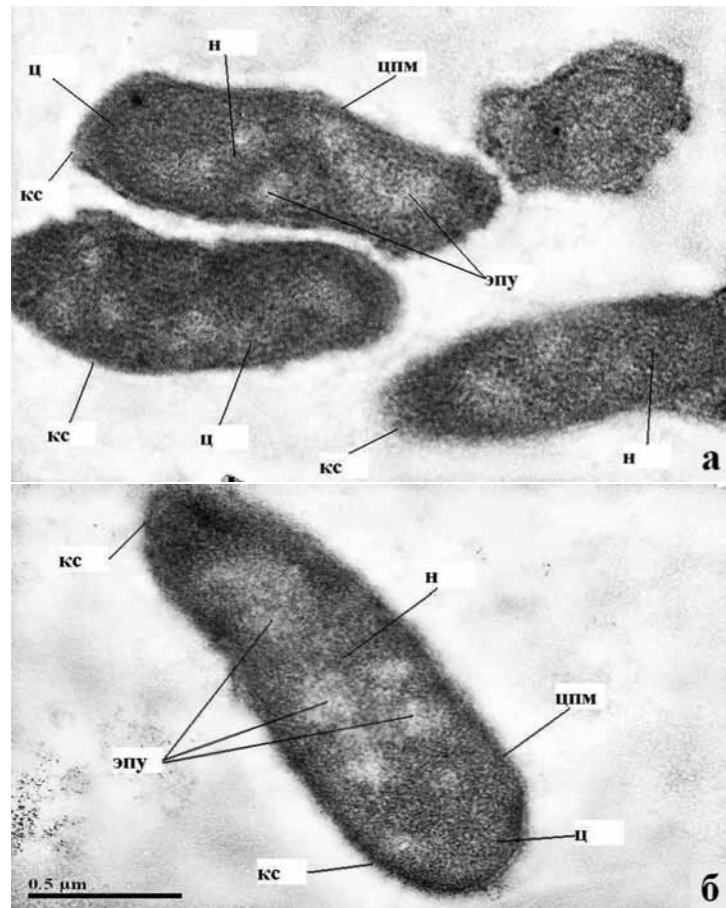


Fig. 5 (a, b). *Pasteurella* cells treated with Dioxigenum (MBC), x50000  
CW – cell wall, CPM – cytoplasmic membrane,  
C – cytoplasm, ETZ – electron transparent zones,  
N – nucleoid

and penetrable for large molecules. Presence of two NO groups in dioxidine molecule facilitates its activity under anaerobic conditions by means of free radical process activation and active oxygen formation.

Gentamicin belongs to aminoglycosides. It penetrates through cell membrane, binds irreversibly to 30S ribosomal subunit specific receptor proteins and prevents the formation of the initiation complex with messenger RNA. This leads to misreading of DNA so that deficient protein from polyribosomes break up and protein synthesis is inhibited. As a result gentamicin transport

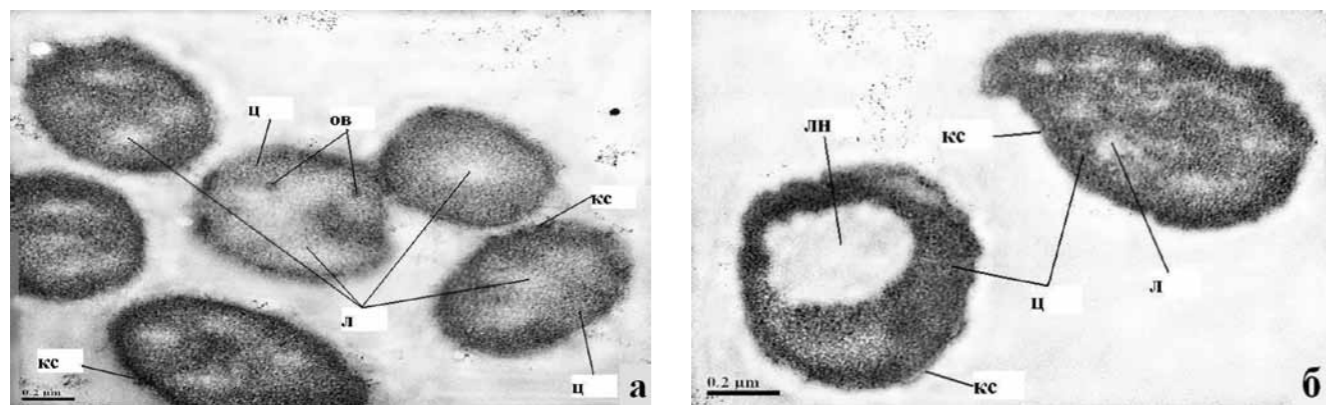


Fig. 6 (a, b). *Pasteurella* cells treated with Dioxigenum (4 MBC), x50000  
CW – cell wall, C – cytoplasm, L – lysis, NL – nucleoid lysis, OI – osmiophil inclusions

speeds up; this leads to intensive cytoplasmic membrane break up and its death [2, 6, 9].

When Dioxigenum is used synergistic effect of the components is ensured by dioxidine and gentamicin joint effect on genetic apparatus and microbial cell wall.

Thinning of the cell wall and loosening of its outer layer detected in and *Pasteurella* are the results of lipopolysaccharide release and phospholipid oxidation induced by dioxidine action. Moreover in *Staphylococcus aureus* dioxidine effected lipid region of lipoteichoic acid and led to loss of vertical structural rigidity and thickening of cell wall.

The abovementioned cytoplasmic membrane partial lysis sites in all bacteria are explained by the fact that positively charged gentamicin binds to membrane protein amino acids which causes break up and escape to intercellular space of K<sup>+</sup> ions, amino acids, bases and proteins. Dioxidine potentiates free radical processes, facilitates the active oxygen formation which influences cytoplasmic membrane lipids and damages membrane stability and permeability.

The occurrence of electron dense regions in cell cytoplasm is indicative of the release of water soluble low-molecular constituents and increase in cell hydration. Besides decrease in K<sup>+</sup> ion concentration results in the loss of constant osmotic pressure inside the cell and interference with inclusion of inorganic phosphorus into structural components and macroergic phosphorus compound formations.

Detected modifications in nucleoid zone are associated with the Dioxigenum direct effect on DNA structure. The nucleic acid is elongated; phosphorous bridges between chains are broken; helices are unwound locally and links between bases in the supercoiling regions of bacterial chromosome are disrupted.

When exposed to 4-fold minimal bactericidal concentration cell walls of *Escherichia* and *Pasteurella* thinned practically completely due to total oxidation of lipid layer. *Staphylococcus* cell wall remained intact owing to a large number of peptidoglycan layers. Cytoplasmic membrane broke up completely.

Vast lysis regions detected in *Escherichia* and *Pasteurella* cells resulted from the fact the cytoplasm lost its vital metabolites (amino acids, bases, proteins) as well as due to its increased hydration and dissolving of its components in water redundancy. The abovementioned changes were less significant in *Staphylococcus* due to partial survival of the cell wall.

Nucleoid lysis detected in all microorganisms was associated with the induction of profound destructive changes in the DNA by dioxidine, protein synthesis inhibition by gentamicin, lack of nucleotides, inorganic phosphorus and high-energy phosphorus compounds interfering with the processes of damaged nucleic acid molecule repair and synthesis of a new molecule.

## CONCLUSIONS

Thus detected ultrastructural and functional changes in *Escherichia*, *Pasteurella* and *Staphylococcus aureus* induced by Dioxigenum bactericidal concentrations are caused by synergistic effect of its active components with different action mechanisms.

## REFERENCES

1. Bryan, L.E., Bacterial resistance and susceptibility to chemotherapeutic agents. – M.; Meditsina, 1984. – 272 p.
2. Gorbenko A.V. Antibiotic resistance of E. coli β-hemolytic strains – Coli enterotoxigena agent in piglets // Veterinarnaya Meditsina. – 2004. – № 83. – P. 59–62.
3. Zuyev N.P., Shakhov A.G., Bukhanov V.D. Development of antimicrobial compositions based on tilosin-containing drugs and study of their preventive and therapeutic efficiency against gastrointestinal and respiratory animal diseases of bacterial etiology // Vital issues of young animal diseases under modern conditions: material for International Scientific Conference, Voronezh, 17–19 September 2008. – Voronezh: Istoki, 2008. – p. 137–142.

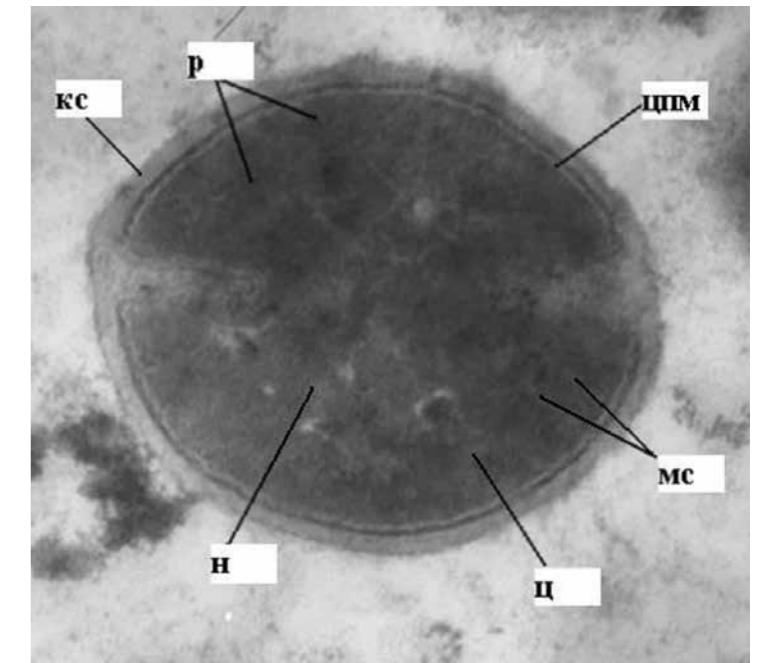


Fig. 7. *Staphylococcus aureus* cell (control), x60000  
CW – cell wall, CPM – cytoplasmic membrane,  
R – ribosomes, MS – mesosome structure,  
C – cytoplasm, N – nucleoid

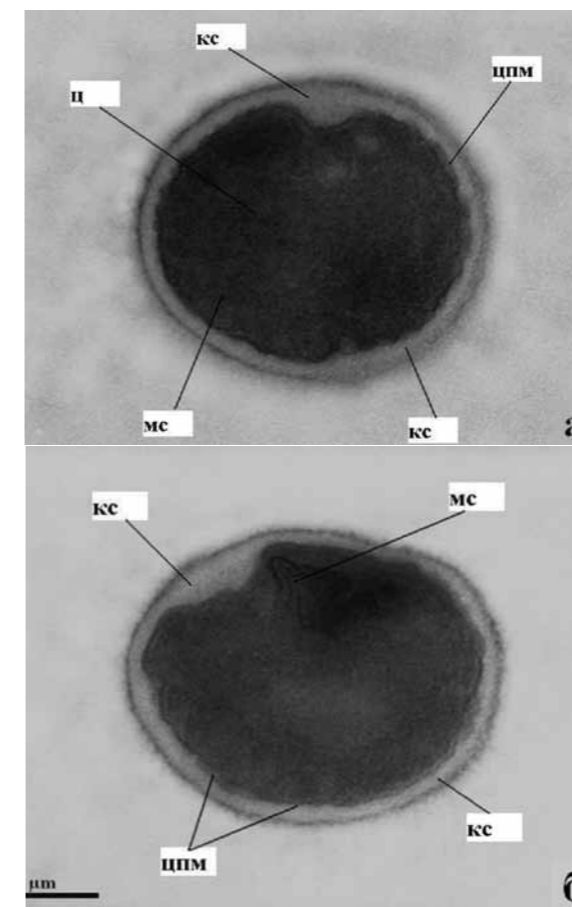


Fig. 8 (a, b). *Staphylococcus aureus* cell treated with Dioxigenum (MBC), x60000  
CW – cell wall, CPM – cytoplasmic membrane,  
MS – mesosome structures, C – cytoplasm

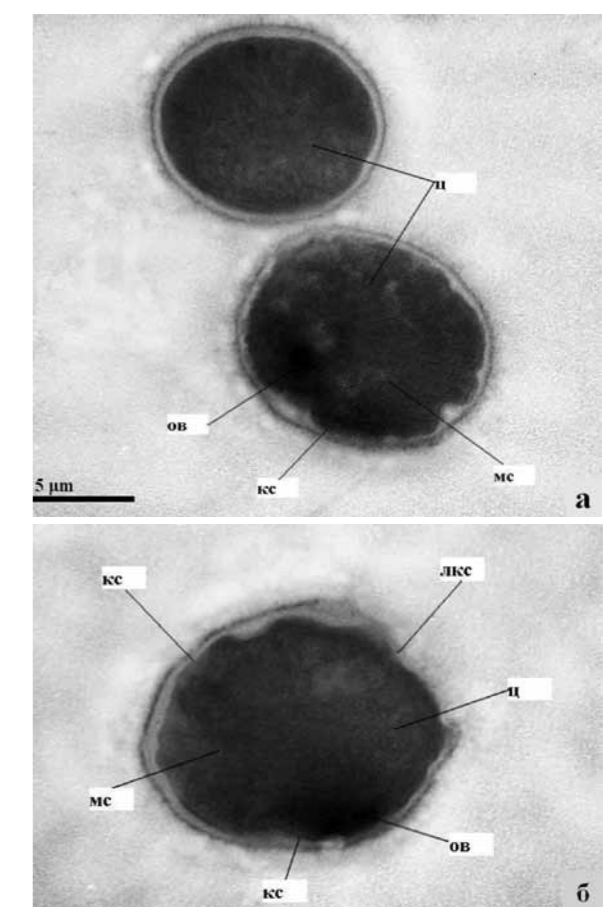


Fig. 9 (a, b). *Staphylococcus aureus* cells treated with Dioxigenum (4 MBC) 9a – x50000, 9b – x60000  
CW – cell wall, CWL – cell wall lysis, C – cytoplasm,  
MS – mesosome structures, OI – osmiophil inclusions



4. Study of antimicrobial resistance of bacterial agents of gastrointestinal, respiratory diseases in piglets / A.G.Shakhov, L.Yu. Sashnina, M.I. Lebedev, Ye.V. Lebedeva // Reports of Russian Academy of Agricultural Sciences. – 2011. – № 2. – P. 53–55.

5. Lagutkin N.A. Chemotherapy against infectious diseases // Veterinariya. – 2006. – № 2. – P. 24–28.

6. Mashkovsky M.D. Medicines: Handbook. – 15-the edition. – M., 2004. – 1152 p.

7. Pruntova O.V. Peculiarities of laboratory diagnostics of animal diseases caused by *Pasteurella multocida* // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health: International Scientific Conference «Infectious Animal Pathology» dedicated to FGBI «ARRIAH» 50-th Anniversary. – Vladimir: OOO «Tranzit – IKS», 2008. – V. 6. – P. 229–243.

УДК 619:578.831.1:578:72:616-079.4

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ, ВЫДЕЛЕННОГО В 2010 ГОДУ ИЗ ПОПУЛЯЦИИ ГОЛУБЕЙ В КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

П.И. Репин<sup>1</sup>, И.П. Пчелкина<sup>2</sup>, И.А. Чвала<sup>3</sup>, Н.Г. Зиняков<sup>4</sup>, В.В. Дрыгин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ведущий биолог; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, E-mail: pavel.repin.2011@mail.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>3</sup> заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц, кандидат ветеринарных наук; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>4</sup> младший научный сотрудник, кандидат биологических наук; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>5</sup> заместитель директора по НИР и развитию, доктор биологических наук, профессор; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

### РЕЗЮМЕ

Представлены данные по изучению биологических свойств изолята вируса ньюкаслской болезни NDV/Pigeon/Rus/Кемерово/232/10, выделенного от голубя из частной голубятни в Кемеровской области в 2010 г. с использованием вирусологических и молекулярно-генетических методов.

**Ключевые слова:** вирус ньюкаслской болезни, парамиксовирус птиц 1 серотипа, сайт нарезания белка F, вирулентность, генотип.

### ВВЕДЕНИЕ

Ньюкаслская болезнь (НБ) – острое контагиозное заболевание, протекающее с поражениями органов респираторной, пищеварительной и нервной систем. Болезнь способна к эпизоотическому распространению. Возбудителем болезни является РНК-содержащий парамиксовирус птиц 1 серотипа (ПМВ-1), относящийся к роду *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae* [5, 6].

Более 200 видов птиц восприимчивы к инфицированию высоко- и низковирулентными ПМВ-1, однако клинические признаки варьируют в широких пределах и зависят от целого ряда факторов, таких как биологические свойства вируса, вид и возраст птицы, наличия ассоциированных заболеваний, условий окружающей среды и иммунного статуса животного. Высоковирулентные изоляты способны вызывать смертность в стадах птиц до 100%, причем в отдельных случаях клинические признаки болезни и патологоанатомические изменения могут быть выражены незначительно ввиду крайне быстрой гибели птиц [3, 4].

Учитывая значительное биологическое разнообразие парамиксовирусов птиц 1 серотипа, для лабораторной диагностики заболевания применяется комплекс вирусологических, молекулярно-генетических и серологических методов [3, 4, 5]. Особое значение для идентификации и дифференциации вируса ньюкаслской болезни (НБ) от прочих парамиксовирусов птиц 1 серотипа имеет определение индекса патогенности при интрацеребральном заражении суточных цыплят и аминокислотная последовательность сайта нарезания белка F. Согласно критериям Всемирной организации охраны здоровья животных (МЭБ), ньюкаслской болезнью может быть признана инфекция птиц, вызванная парамиксовирусом птиц 1 серотипа, отвечающая не менее, чем одному из критериев: вирус имеет значение индекса патогенности (ICPI) более 0,7, или наличие основных аминокислот (аргинин и лизин в позициях 113-116) в сайте нарезания (F2-белок) и фенилаланина в позиции 117 (F1-белок). Соответственно, вирус, не отвечающий приведенным критериям, идентифицируется как ПМВ-1 [4].

Несмотря на широкое применение вакцин против НБ в промышленном птицеводстве, инфекция по-прежнему остается одной из наиболее значимых проблем. Проводимая вакцинопрофилактика позволяет сохранять контроль над болезнью в стадах сельскохозяйственных птиц, но циркулирующий вирус в популяциях диких и синантропных птиц представляет собой постоянную угрозу. Таким образом, своевременное выявление и изучение биологических свойств вирусов в популяциях диких птиц является актуальной задачей для ветеринарии.

LaSota Vaccine

RTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGG<sup>G</sup><sub>112</sub>RQGR<sup>L</sup><sub>117</sub>IGAIIGG

NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10

RTLTTALLNPLGDSIRRIQGSVSTPGG<sup>K</sup><sub>112</sub>RQKR<sup>F</sup><sub>117</sub>IGAIIGS

Рис. 1. Выведенные аминокислотные последовательности, включающие сайт расщепления белка F<sub>0</sub> в позиции 112-117, из нуклеотидных последовательностей фрагмента гена F исследуемого изолята и вакцинного штамма Ла Сота

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение вируса.** Вирусовыделение проводили в 10-сут. эмбрионах СПФ-кур (КЭ). Из биологического материала готовили 10% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2) и вводили в аллантаисную полость КЭ в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Эмбрионы, погибшие после 24 ч инкубации и более, использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) и проведения дальнейших исследований.

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** Для идентификации изолята ВНБ применяли РТГА в соответствии с общепринятой методикой [4] с использованием антигенов и гипериммунных сывороток к вирусам гриппа и ньюкаслской болезни птиц производства ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир) и Института зоофилактики (IZSve, Италия).

**Определение титра инфекционности вируса НБ.** Применяли метод 10-кратных последовательных разведений (от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-9</sup>). Каждое разведение вируса инокулировали в аллантаисную полость четырем КЭ. Титр вируса в исходном материале определяли по методу Кербера и выражали в единицах ЭИД<sub>50</sub>/мл.

**Определение гемагглютинирующей активности вируса НБ.** Постановку реакции гемагглютинации (РГА) осуществляли по стандартной методике [4].

**Определение индекса патогенности вируса НБ.** Интрацеребрально каждому из десяти суточных СПФ-цыплят вводили по 0,05 см<sup>3</sup> исследуемой вирусосодержащей суспензии в разведении 1:10 на стерильном ФБР.

В течение 8 сут. ежедневно оценивали клиническое состояние каждой из птиц, и присваивали коэффициент: 0 – клинически здорова; 1 – отмечены признаки заболевания (угнетение, отказ от корма и воды, отеки, нарушения деятельности респираторного или пищеварительного трактов, нервной системы); 2 – мертва. Погибшим птицам присваивали коэффициент 2 ежедневно в течение 8 дней эксперимента [4].

Индекс патогенности (ICPI) вычисляли по формуле:

$$ICPI = \frac{\sum_{i=1}^8 (B_i \times 1 + P_i \times 2)}{8 \times N}$$

где B<sub>i</sub> – число больных в сутки i;

P<sub>i</sub> – число погибших в сутки i;

N – общее количество птиц в эксперименте

**Выделение РНК, получение фрагментов для ПЦР.** РНК выделяли с помощью коммерческого набора с сорбентом Nucleos<sup>TM</sup> производства ООО БиоКом (Россия, г. Москва) согласно инструкции производителя. Синтез

первой цепи комплементарной ДНК на вирусной РНК проводили с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса миелобластома птиц (Promega, США). Для реакции обратной транскрипции к 10 мкл раствора суммарной РНК добавляли реакционную смесь, содержащую 2 мкл 10 мМ dNTP, 4 мкл 5x ревертазного буфера, 1 мкл 10 мМ вирусспецифического прямого праймера, 0,25 мкл ревертазы и воду до конечного объема 20 мкл, перемешивали и инкубировали при 42°C 30 мин. После инкубации инактивировали фермент при 95°C 3 мин и быстро охлаждали смесь. Синтезированную кДНК использовали для амплификации фрагмента генома. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. В пробирку объемом 0,5 мл вносили 4 мкл раствора кДНК и 21 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл 10 мМ прямого и обратного праймеров, 1 мкл 10 мМ dNTP, 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР, 2,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мкл Taq ДНК-полимеразы (Promega, США) (5 ед./мкл), деионизованную воду до конечного объема. Амплификацию проводили при следующем режиме: 95°C – 3 мин, 35 циклов 95°C – 0,5 мин, 52°C – 0,5 мин, 72°C – 1 мин.

**Секвенирование, генетический и филогенетический анализ.** Перед проведением реакции секвенирования очистку продуктов реакции от остальных компонентов ПЦР-смеси проводили с использованием коммерческого набора ДНК-сорб-В (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва, Россия) согласно инструкции производителя.

Реакцию секвенирования проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, США). Использовали набор BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Для удаления солей и несвязанных BigDye<sup>®</sup> терминаторов из реакционных секвенирующих смесей был использован набор BigDye<sup>®</sup> X Terminator<sup>™</sup> Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей полученных фрагментов ДНК проводили, используя пакеты прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3, и MEGA 4. Выравнивание осуществляли с помощью программы ClustalW. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности ВНБ, опубликованных в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетического дерева проводили с помощью алгоритма NJ и комплексной модели замен наибольшего правдоподобия для области длиной 374 нуклеотидов от начала рамки считывания гена F, кодирующей сайт расщепления белка F.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В июне 2010 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» поступили на исследование пробы биологического материала от трех павших голубей с частной голубятни, расположенной в Ленинск-Кузнецком районе Кемеровской области, с подозрением на НБ.



При исследовании трех суспензий биологического материала в ПЦР геном ВНБ был выявлен во всех пробах. В результате дальнейших молекулярно-генетических исследований была определена нуклеотидная последовательность фрагмента F-гена изолята NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10.

В результате анализа полученной нуклеотидной и аминокислотной последовательностей было установлено, что сайт нарезания белка F<sub>0</sub> несет маркеры вирулентности (парные основные аминокислоты лизин (K) и аргинин (R)) в позициях 112-113 и 115-116, соответственно, и фенилаланин (F) в позиции 117 (рис. 1). Сайт имеет структуру -<sup>112</sup>KRQKR-F<sup>117</sup>-, которая указывает на вирулентные свойства изолята NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10.

По результатам филогенетического анализа изолята NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 относится к генотипу VI, подтипу VIb/2 по классификации, предложенной D. Ujvari [5]. На рис. 2 приведена дендрограмма, построенная с использованием нуклеотидной последовательности изолята NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 и ряда референтных штаммов и изолятов генотипа VI, подтипа VIb, генетических групп VIb/1 и VIb/2, опубликованных при изучении генетических свойств парамиксовирусов голубей [5].

Изначально генетическая группа VIb/2 была предложена для нескольких изолятов, выделенных в Хорватии в 1995-2002 гг. (AY150144, AY150162, AY150163, AY150165). Изоляты данной генетической группы периодически выявляются на территории различных регионов Российской Федерации [1, 2].

Ближайшим к изучаемому изоляту является вирус, выделенный от голубя в Казахстане: APMV-1/pigeon/Almaty/1064/05 (JN806236), причем нуклеотидные отличия анализируемого фрагмента составляют 2,7%. Отличие по изученному участку фрагмента гена F между изолятами NDV/Pi/Rus/Kemerovo/0232/10, APMV-1/pigeon/Almaty/1064/05 и изолятами группы из Хорватии составило 6% (рис. 2). Таким образом, было показано, что изолят NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 обладает вирулентными свойствами и относится к генетической линии VI ВНБ (VIb/2), циркулирующего в популяциях голубей.

С целью выделения вируса суспензии проб биологического материала инокулировали в аллантаисную полость 10-сут. эмбрионов СПФ-кур. Через 24-72 ч инкубации произошла гибель всех эмбрионов. На тушках эмбрионов отмечали кровоизлияния, наиболее выраженные в области лап и головы. В РГА было установлено наличие в ЭЭЖ гемагглютинирующего агента

Табл. Результаты наблюдения за цыплятами при определении индекса патогенности

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птиц	Период наблюдений, сут.								ICPI
		1	2	3	4	5	6	7	8	
NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10	здоровые	10	8	4	8	0	0	0	0	1,39
	больные	0	1	3	1	1	0	0	0	
	павшие	0	1	3	1	9	10	10	10	





в титре  $6 \log_2$ . В результате типирования микроорганизма в РТГА с панелью гипериммунных сывороток к вирусу гриппа (H1-N16 подтипы) и парамиксовирусов птиц (1-9 серотипы) гемагглютинирующая активность была подавлена только сывороткой против ПМВ-1 (ВНБ) в титре  $8 \log_2$ . Референтный антиген ВНБ взаимодействовал с гипериммунной сывороткой в титре  $10 \log_2$  (положительный контроль). Более низкая активность сыворотки (в данном случае, на  $2 \log_2$ ) при взаимодействии с полевыми изолятами ВНБ может быть следствием антигенных различий между изолятом и производственным штаммом вируса.

Титр инфекционной активности изолята при титровании в КЭ составил  $7,75 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{мл}$ , что позволило использовать выделенный вирус для экспериментального воспроизведения инфекции у цыплят.

Для изучения вирулентных свойств изолята ВНБ провели эксперимент по определению индекса патогенности при интрацеребральном заражении цыплят. Результаты клинического наблюдения за цыплятами представлены в таблице.

При внешнем осмотре инфицированных цыплят отмечали такие признаки заболевания, как угнетение, отказ от корма и воды, парезы конечностей и параличи; при вскрытии наблюдали гиперемии тканей и кровоизлияния в головном мозге, кишечнике, отечность легких. Инкубационный период длился 1-3 сут., и все цыплята погибли в течение 5 сут. эксперимента. Как видно из представленных данных, индекс патогенности имеет значение 1,39, что позволяет идентифицировать изолят NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 как вирулентный ВНБ.

Процедура определения ИСП1 достаточно трудоемка, требует наличия помещений с соответствующим

уровнем биобезопасности и квалифицированного персонала, ввиду чего рекомендована МЭБ для изучения изолятов ВНБ, выделенных при вспышках болезни, сопровождаемых высокой заболеваемостью и смертностью птиц, причем для идентификации рекомендуется первый полученный изолят. В лабораторной диагностике, как правило, данный эксперимент не является обязательным при выделении ВНБ от клинически здоровых птиц, например, при проведении мониторинговых мероприятий.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что изолят NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 относится к генетической группе вируса Vlb/2, который циркулирует в популяциях голубей. Сайт нарезания белка F имеет структуру  $^{-112}\text{KRQKR-F}^{117}$ , характерную для вирулентных парамиксовирусов птиц 1 серотипа. При интрацеребральном заражении цыплят подтверждены его вирулентные свойства.

Выявление вирулентного ВНБ в популяциях голубей демонстрирует необходимость проведения мониторинговых мероприятий и изучения биологических свойств изолятов не только в стадах сельскохозяйственных, но и диких и синантропных птиц, что позволит своевременно оценить степень угрозы и осуществить соответствующие ветеринарно-санитарные мероприятия.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вирус ньюкаслской болезни, выявленный в популяциях диких и синантропных птиц на территории России в 2008 году / И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, Т.Б. Манин [и др.] // *Вет. медицина: міжвід. тем. наук. зб.* – 2009. – Вип. 92. – С. 417–422.

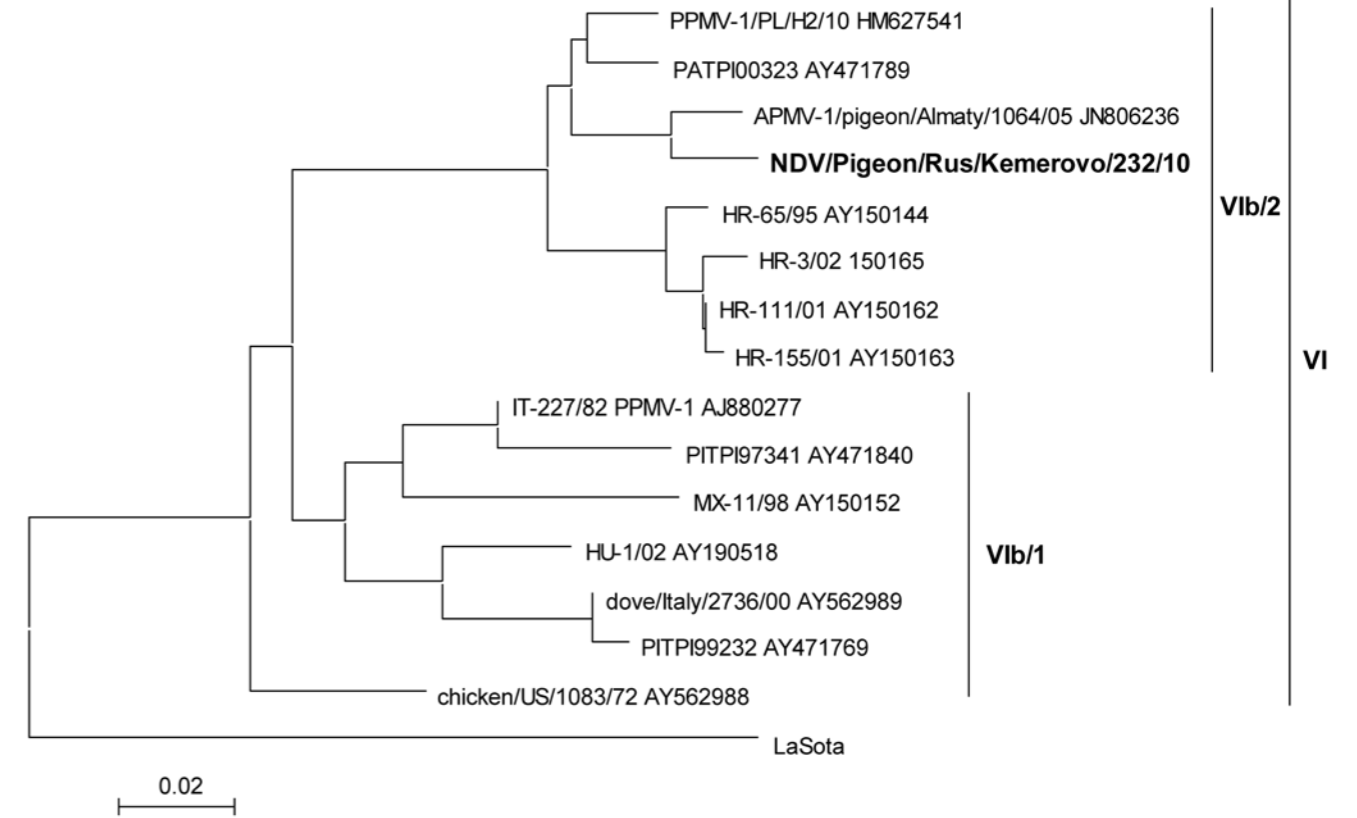


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное методом NJ по нуклеотидным последовательностям участка гена F (1-374 п.н.), штаммов и изолятов ВНБ генотипа VI, представленных в GenBank, а также изолята NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10, выделенного на территории РФ

2. Определение генотипической принадлежности изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных на территории Российской Федерации в 2006 году / И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, Т.Б. Манин [и др.] // *Вет. патология.* – 2007. – № 4 (23). – С. 162–167.

3. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons / E.W. Aldous, C.M. Fuller, J.K. Mynn, D.J. Alexander // *Avian Pathol.* – 2004. – Vol. 33, № 2. – P. 258–269.

4. Newcastle disease // O.I.E. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, adopted 2012.

5. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission / D. Ujvari, E. Wehmann, E.F. Kaleta [et al.] // *Virus Res.* – 2003. – Vol. 96, № 1–2. – P. 63–73.

6. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus / T. Toyoda, T. Sakaguchi, K. Imal [et al.] // *Virology.* – 1987. – Vol. 158. – P. 242–247.

# BIOLOGICAL PROPERTIES OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS ISOLATED FROM PIGEON POPULATION IN KEMEROVO OBLAST IN 2010

P.I. Repin<sup>1</sup>, I.P. Pchelkina<sup>2</sup>, I.A. Chvala<sup>3</sup>, N.G. Zinyakov<sup>4</sup>, V.V. Drygin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Leading Biologist; FGBI "ARRIAH", Vladimir, E-mail: pavel.repin.2011@mail.ru

<sup>2</sup>Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>3</sup>Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>4</sup>Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>5</sup>Deputy Director for Research and Development, Doctor of Science (Biology), Professor; FGBI "ARRIAH", Vladimir

## SUMMARY

The paper provides data on studying biological properties of Newcastle disease virus isolate NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 derived from a pigeon in a private pigeon house in the Kemerovo oblast in 2010 using virological and molecular genetic methods.

**Key words:** Newcastle disease virus, serotype 1 avian paramyxovirus, protein F cleavage site, virulence, genotype.

## INTRODUCTION

Newcastle disease (ND) – is an acute contagious disease characterized by lesions in respiratory, alimentary and nervous systems. The disease can spread epidemically. The disease agent is RNA- containing serotype 1 avian paramyxovirus (APMV-1) belonging to genus *Avulavirus* of *Paramyxoviridae* family [5, 6].

More than 200 of avian species are susceptible to highly and low virulent APMV-1, however clinical signs vary widely and depend on many factors such as virus biological properties, host species and age, presence of associated diseases, environmental conditions and animal immune status. High virulent isolates are able to cause 100% death in poultry flocks. In specific cases clinical signs of the disease and postmortem lesions are mild due to extremely quick poultry death [3, 4].

Taking into account considerable biological variety of serotype 1 avian paramyxoviruses a complex of virological, molecular genetic and serological techniques is used for disease laboratory diagnostics [3, 4, 5]. The determination of pathogenicity index in case of intracerebral infection of day old chicks and amino acid sequence

of protein F cleavage site are of specific importance to NDV identification and its differentiation from other serotype 1 avian paramyxoviruses. According to the OIE criteria Newcastle disease is avian infection caused by serotype 1 avian paramyxoviruses meeting at least one of the following criteria: the virus has an intracerebral pathogenicity index (ICPI) in 1-day-old chicks of 0.7 or greater, or basic amino acids (arginine and lysine residues at positions 113-116) at cleavage site (protein F2) and phenylalanine at position 117 (protein F1). Consequently, the virus which does not meet the above mentioned criteria is identified as APMV-1[4].

Despite of extensive ND vaccination in commercial poultry production the infection still remains one of the most significant problems. Vaccine prophylaxis allows disease control in poultry flocks but virus circulation in wild and synanthropic bird populations constitutes a constant threat. Hence, timely detection and study of virus biological properties in wild bird populations remain a vital concern for veterinary medicine.

## MATERIALS AND METHODS

**Virus isolation.** The virus was isolated in 10-day-old embryos of SPF chickens (CE). 10% suspension was prepared from biological material using phosphate buffered saline (pH 7.2). It was inoculated at 0.2 cm<sup>3</sup> volumes into CE allantoic cavity. Embryos that died after 24 hours or more of incubation period were used for extra-embryonic fluid (EEF) collection and further investigations.

**Hemagglutination Inhibition Test (HI).** The HI test was performed for identification of NDV isolate according to



LaSota Vaccine

RTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGG<sub>112</sub>RQGR<sub>117</sub>IGAIIGG

NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10

RTLTTLLNPLGDSIRRIQGSVSTPGGK<sub>112</sub>RQKRF<sub>117</sub>IGAIIGS

Fig. 1. Amino acid sequences including F0 protein cleavage site at positions 112-117 derived from F gene fragment nucleotide sequences of studied isolate and LaSota vaccine strain

accepted methods using avian influenza and Newcastle disease virus antigens and hyperimmune sera produced by the FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH", Vladimir) and Veneto Institute of Experimental Zooprophyllaxis (IZSVE, Italy).

**NDV infectivity titer determination.** There method of consecutive 10-fold dilutions (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-9</sup>) was used. Each virus dilution was inoculated into allantoic cavity of four CEs. The virus titer in the original material was determined using Kaerber method and it was expressed as EID<sub>50</sub>/ml.

**NDV haemagglutination activity determination.** The hemagglutination test was conducted in accordance with standard methods[4].

**NDV pathogenicity index determination.** 0.05 cm<sup>3</sup> of virus-containing suspension diluted 1:10 in sterile PBS was injected intracerebrally into each of ten SPF 1- day-chicks.

Each chick was examined every 24 hours for 8 days. The chicks were scored 0 if normal, 1 if sick (depression, anorexia, oedema, disorders of respiratory, alimentary and nervous systems), 2 if dead. Dead chicks were scored 2 every 24 hours during 8-day experiment.

The formula for calculating the pathogenicity index (ICPI) is as follows:

$$ICPI = \frac{\sum_{i=1}^8 (\beta_i \times 1 + \pi_i \times 2)}{8 \times N}$$

Where:  $\beta_i$  - number of sick chicks per day  
 $\pi_i$  - number of dead chicks per day  
 $N$  - total number of chicks used in the experiment

**RNA recovery, production of fragments for PCR.** RNA was recovered using a commercial kit with Nucleos<sup>+</sup>™ sorbent produced by OOO BioKom (Russia, Moscow) following manufacturer's instructions. First strand synthesis of complementary DNA on virus RNA was conducted with RNA-dependent DNA polymerase of avian myeloblastosis virus (Promega, USA). The reaction mixture containing 2  $\mu$ l of 10 mM dNTP, 4  $\mu$ l of 5x revertase buffer, 1  $\mu$ l of 10 mM of virus specific forward primer, 0.25  $\mu$ l of revertase and water was added to 10  $\mu$ l of total RNA solution to final volume of 20  $\mu$ l for reverse transcriptase assay. It was mixed and incubated for 30 minutes at 42°C. After incubation enzyme was inactivated for 3 minutes at 95°C and the mixture was rapidly cooled. Synthesized

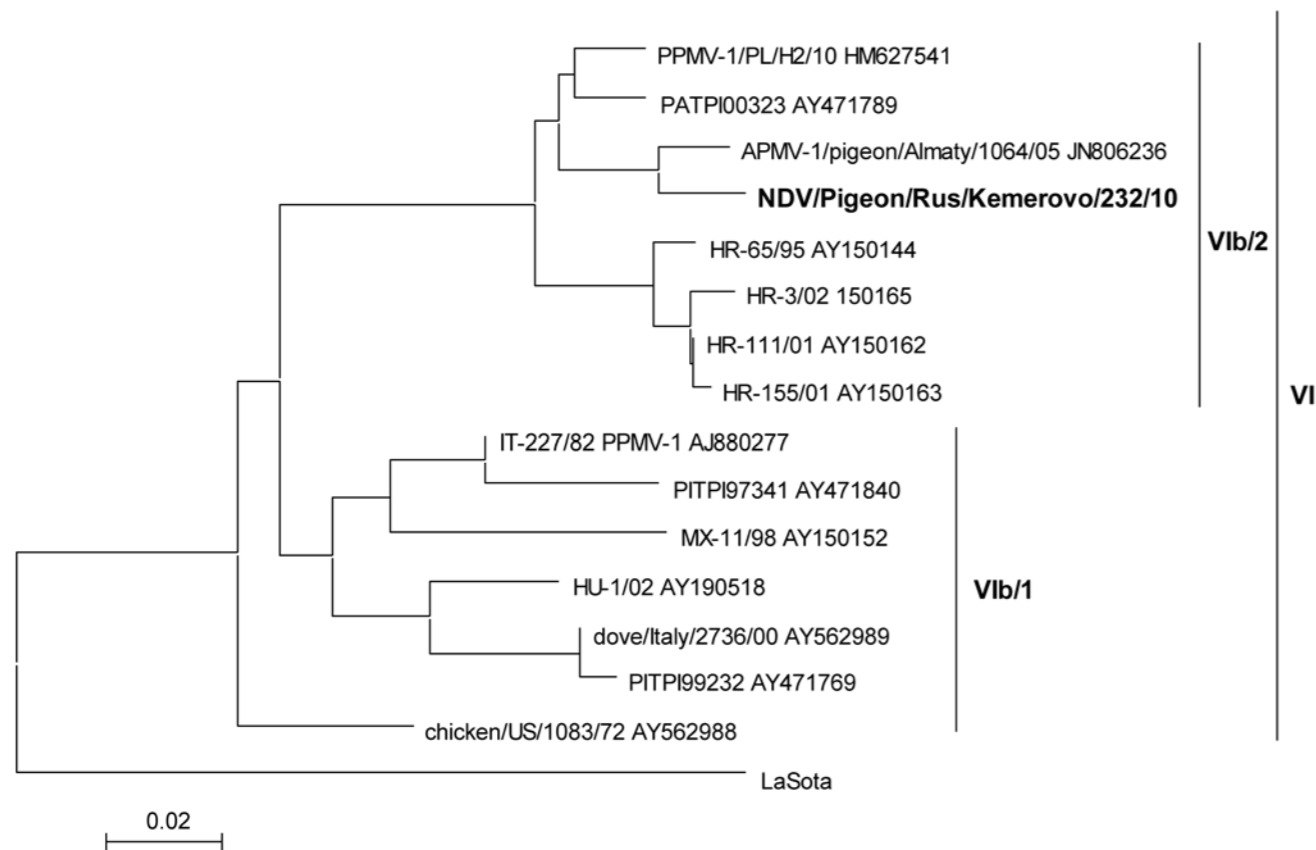


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed from nucleotide sequences of F gene region (1-374 bp), genotype VI NDV strains and isolates presented in GenBank, NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate recovered in the RF territory using NJ method

cDNA was used for genome fragment amplification. Total volume of reaction mixture was 25 µl. 4 µl of cDNA solution and 21 µl of reaction mixture containing 1 µl 10 mM of forward and reverse primers, 1 µl of 10 mM dNTP, 2.5 µl 10x of buffer for PCR, 2.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µl of Taq DNA polymerase (Promega, USA), deionized water were added into 0.5 ml test tube to final volume. The amplification was conducted in the following mode: 95°C – 3 minutes, 35 cycles; 95 °C – 0.5 minutes, 52 °C – 0.5 minutes, 72 °C – 1 minute.

**Sequencing, genetic and phylogenetic analysis.** Purification of reaction products from other PCR mixture components was performed using commercial kit DNA-sorb-B before sequencing (FGUN CNIIE Rospotrebnadzor, Moscow, Russia) according to the manufacturer's instructions.

Sequencing was performed using an automatic ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA). For removal of salts and unbound BigDye® terminators from reaction sequencing mixtures was used kit BigDye® XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, USA).

Nucleic sequence analysis was conducted using software package BioEdit, version 7.0.5.3 and MEGA 4. Alignment was conducted using Clustal W program. NDV nucleic sequences published in data base GenBank were used for comparison. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The phylogenetic tree was constructed using NJ algorithm and complex replacement model with maximum likelihood for 374 nucleotide region from F gene reading frame encoding F protein cleavage site.

### RESULTS AND DISCUSSION

In June 2010 the FGBI "ARRIAH" received samples of ND suspected biological materials from three dead pigeons from private pigeon house located in the Leninsk-Kuznetsk Rayon of the Kemerovo oblast for investigation.

The testing of three biological material suspensions by PCR demonstrated the presence of NDV genome in all samples. Further molecular and genetic investigations determined F-gene fragment nucleic sequence of NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate. The analysis of

### Results of chick observation in case of pathogenicity index determination

Isolate under study	Clinical state of birds	Observation period, days								ICPI
		1	2	3	4	5	6	7	8	
NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10	normal	10	8	4	8	0	0	0	0	1,39
	sick	0	1	3	1	1	0	0	0	
	dead	0	1	3	1	9	10	10	10	



obtained nucleotide and amino acid showed that F0 protein cleavage site carries virulence markers (paired basic amino acids lysine (K) and arginine (R)) at positions 112-113 and 115-116, respectively, and phenylalanine (F) at position 117 (Fig. 1). Site has the following structure -<sup>112</sup>KRQKR<sup>117</sup>-. This structure is indicative of NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate virulent characteristics.

Subsequent to phylogenetic analysis results NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate belongs to genotype IV, subtype Vlb/2 according to classification suggested by D. Ujvari [5]. Figure 2 presents a dendrogram constructed using NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate nucleotide sequence, a range of referent strains and genotype VI, subtype Vlb isolates, genetic groups Vlb/1 and Vlb/2 published during study of pigeon paramyxovirus genetic characteristics [5].

Originally Vlb/2 genetic group was suggested for several isolates recovered in Croatia in 1995-2002 (AY150144, AY150162, AY150163, AY150165). Isolates of this genetic group are continuously recovered in different areas of the RF [1, 2].

Virus isolated from a pigeon in Kazakhstan is closely related to the isolate under study i.e. APMV-1/Pigeon/Almaty/1064/05 (JN806236) where nucleotide differences of analyzed fragment make up 2.7%. The difference between NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10, APMV-1/pigeon/Almaty/1064/05 and Croatia group isolates in F gene fragment under study made up 6% (Fig. 2). Thus, it was demonstrated that NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate has virulent characteristics and belongs to genetic lineage VI NDV (Vlb/2) circulating in pigeon populations. Biological material sample suspensions were inoculated into allantoic cavity of 10-day-old SPF chick embryos for virus isolation. In 24-72 hours of incubation all embryos died.

In dead embryos hemorrhages which were more severe on feet and heads were noticed. Hemagglutination test demonstrated the presence of haemagglutinating agent at the titer 6 log<sub>2</sub> in EEF. As result of microorganism typing by HI using a panel of hyperimmune sera to influenza virus (subtypes H1-H16) and avian paramyxoviruses (serotypes 1-9) a hemagglutinating activity was suppressed only using serum against PMV-1 (NDV) at the titer of 8 of log<sub>2</sub>. NDV referent antigen interacted with hyperimmune serum at the titer of 10 log<sub>2</sub> (positive control). Lower serum activity (in this case at 2 log<sub>2</sub>) at interaction with NDV field isolates can be caused by antigen differences between an isolate and a virus production strain.

The titer of isolate infectivity at titration in CE was 7. 75 EID<sub>50</sub>/ml and that allowed using isolated virus for experimental infection of chicks. For the purpose of NDV isolate virulent property study an experiment on pathogenicity index determination in case of intracerebral chick infection was conducted. The results of chick clinical observation are presented in the following table.

During visual inspection of infected chicks the following clinical signs were observed: depression, anorexia, feet paresis and paralysis. The necropsy showed tissue hyperemia and hemorrhages in brains, intestine and lung oedema. The incubation period lasted 1-3 days and all chicks died within 5 days of the experiment. The presented data demonstrate that pathogenicity index equals 1.39 and that allows identifying NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate as virulent NDV.

The procedure of ICPI determination is quite complicated and requires an appropriate biosecurity level facilities as well as qualified staff. That's why it is recommended by the OIE for studying NDV isolates recovered during disease outbreaks characterized by



high morbidity and mortality. Herewith the first recovered isolate is recommended for identification. As a rule, in laboratory diagnostics the conduction of this experiment in case of NDV extraction from clinically healthy birds is not obligatory, for instance, during monitoring.

### CONCLUSION

The conducted investigations demonstrate that NDV/Pigeon/Rus/Kemerovo/232/10 isolate belongs to virus IVb/2 genetic group, which circulates in pigeon populations. F protein cleavage site has the structure <sup>-112</sup>KROKR-F<sup>117</sup>- typical for virulent serotype 1 avian paramyxoviruses. Intracerebral chick infection confirms its virulent characteristics.

Detection of virulent NDV in pigeon populations demonstrates the necessity of monitoring conduction and study of isolate biological characteristics not only in farm flocks but also in wild and synanthropic birds. That will allow timely assessment of threat level and taking appropriate veterinary and sanitary measures.

### REFERENCES

1. Newcastle disease virus isolated in wild and synanthropic bird populations in the territory of Russia

in 2008 / I.P. Pchelkina, S.N. Kolosov, T.B. Manin [et al.] // Veterinary medicine: mizhvid.tem.nauk.zb.- 2009.- No. 92.- P. 417 - 422.

2. Determination of genotypes of Newcastle disease isolates recovered in the territory of Russia in 2006 / I.P. Pchelkina, S.N. Kolosov, T.B. Manin [et al.] // Veterinary pathology. - 2007.- No4 (23). - P. 162-167.

3. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons / E.W. Aldous, C.M. Fuller, J.K. Mynn, D.J. Alexander // Avian Pathol. - 2004. - Vol. 33, № 2. - P. 258-269.

Newcastle disease // O.I.E. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, adopted 2012.

4. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (Columba livia) and suggests multiple species transmission / D. Ujvari, E. Wehmann, E.F. Kaleta [et al.] // Virus Res. - 2003. - Vol. 96, № 1-2. - P. 63-73.

5. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus / T. Toyoda, T. Sakaguchi, K. Imal [et al.] // Virology. - 1987. - Vol. 158. - P. 242-247.

УДК: 619:616.98:578.842.1:616 – 036.22

## ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ РАССЛЕДОВАНИЕ ВСПЫШЕК АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ (НА ПРИМЕРЕ ЭПИЗООТИИ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ)

А.В. Саввин<sup>1</sup>, О.Н. Петрова<sup>2</sup>, Н.С. Бардина<sup>3</sup>, С.А. Дудников<sup>4</sup>, О.Ю. Горюшев<sup>5</sup>, С.Г. Ремыга<sup>6</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, savvin@arriah.ru

<sup>2</sup> заведующий сектором ветеринарной эпизоотологии РФ информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>3</sup> младший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>4</sup> руководитель информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>5</sup> ведущий ветврач референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>6</sup> младший научный сотрудник референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

### РЕЗЮМЕ

В статье представлены сведения о вспышках африканской чумы свиней в Краснодарском крае, а также подробно описана техника эпизоотологического расследования в полевых условиях.

**Ключевые слова:** африканская чума свиней, вспышка, эпизоотологическое расследование.

### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (болезнь Монтгомери, АЧС) широко распространилась на территории Российской Федерации, Южный и Северо-Кавказский федеральные округа можно считать эндемичными по заболеванию. В естественных условиях к заболеванию восприимчивы домашние (рис. 1) и дикие свиньи. Заражение происходит при контакте здоровых животных с больными. Данное заболевание чрезвычайно опасно для свиноголовья, поскольку не поддается лечению и вакцинопрофилактике.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использованы результаты эпизоотологического обследования очагов АЧС в Краснодарском крае.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ Microsoft Excel и методов ретроспективного анализа [5]. Пространственно-географический анализ реализован в программной среде GIS - ESRI.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимость детального и скрупулезного исследования любого случая возникновения АЧС является регламентированной обязанностью соответствующих

органов и обусловлена в большей степени как самим заболеванием, относящимся к условной группе «особо опасных», так и сложившейся чрезвычайной ситуацией в стране [1].

*Основные особенности эпизоотической*

*обстановки по африканской чуме свиней в крае*

Официальная статистика (итоговые сведения ФГБУ «Центр ветеринарии» на 16.11.2011) и оперативная информация с мест свидетельствуют об ухудшающейся эпизоотической ситуации по АЧС в Краснодарском крае.

По данным на конец 2010 г. на территории края было зарегистрировано 24 вспышки АЧС, из них 12 – среди диких кабанов (рис. 2). Практически все случаи заболевания кабанов приурочены к высокогорной зоне на юге региона. Вспышки АЧС среди свиней личных подворий и хозяйств разного уровня собственности (n = 12) локализованы в восточной или северной части территории края. Угрожаемая 100-километровая зона охватывает практически весь регион.

Новая волна заболеваний наблюдалась в 2011 г.

По состоянию на 16 ноября 2011 г. зарегистрировано 18 вспышек заболевания, большая часть которых произошла на сельскохозяйственных предприятиях разного уровня. Общая численность свиней в неблагополучных пунктах - 59924 гол., заболело - 514 гол., пало - 301 гол. В каждом очаге был наложен карантин и проведены соответствующие мероприятия. Эпизоотическую ситуацию по АЧС в Краснодарском крае на 16 ноября 2011 г. можно охарактеризовать как «критическую».

*Эпизоотологическое расследование*

*при проведении эпидобследования хозяйства*

Залогом успешного осуществления мер по ликвидации очага АЧС является эпизоотологическое исследование



Рис. 1. Свинопоголовье на ферме



Рис. 2. Вспышки АЧС на территории Краснодарского края 2008-2011 гг.

дование, в рамках которого необходимо установить цели и задачи, составить примерный план действий. По результатам исследований составляется план противоэпизоотических мероприятий, который реализуется соответствующими структурами.

Эпизоотологический анализ включает специальные приемы и способы: сравнительное историческое,

географическое описание, эпизоотологическое обследование и эксперимент. Математическая обработка материалов позволяет уточнить и систематизировать полученные результаты. Методологически грамотно проведенное эпизоотологическое расследование вспышки, возникшей на предприятии любого уровня или в частном подворье, позволяет выявить основной фактор развития эпизоотии [3, 4].

На примере проведенного эпизоотического обследования и анализа осуществленных ветеринарно-санитарных мероприятий в очаге АЧС на территории хозяйства (станция Краснодарского края) рассмотрена эффективность принимаемых мер защиты предприятия от возможного заноса заболевания и принята попытка вычленения основного фактора риска возникновения заболевания на предприятии.

#### I. Характеристика предприятия

Характеристика и географическая локализация свиноварных ферм (СТФ) № 1 и № 2 хозяйства. Основным направлением деятельности хозяйства является растениеводство, молочное скотоводство и свиноводство. Территория СТФ № 1 огорожена по периметру бетонным забором, при въезде на территорию фермы расположен наливной крытый дезбарьер. В журнале регистрации посещений фиксируется въезжающий транспорт. Количество работников на СТФ № 1 – 43 человека, СТФ № 2 – 90 человек, оборудован санпропускник. Проводится строгий контроль содержания свинопоголовья в личных подсобных хозяйствах работников СТФ № 1 и № 2. Скотомогильники и биотермические ямы на территории сельхозпред-



Рис. 3. Дезбарьер

приятий не зарегистрированы. Утилизация биологических отходов организуется путем сжигания в крематоре на территории СТФ № 1 и № 2.

Поголовье размещается в 11 корпусах на каждой ферме, имеется кормоцех и склад для хранения кормов, корма готовятся в кормоцехах. Подъездные пути имеют твердое грунтовое покрытие. СТФ № 1 и № 2 хозяйства укомплектованы ветеринарными специалистами в полном объеме. Регулярно проводился мониторинг биоматериала на исключение АЧС в государственном бюджетном учреждении Краснодарского края (ГБУ КК) «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория».

#### II. Развитие эпизоотии

Первые признаки заболевания на СТФ № 2 были замечены 15.09.2011 г. у свиноматок из корпусов № 1 и № 6 (понос, рвота, шаткая походка, отказ от корма, повышение температуры тела до 41°C). В ночь с 15 на 16 сентября 2011 г. пало 5 свиноматок из корпуса № 1, 2 свиноматки - из корпуса № 6. В течение суток (16.09) пало ещё 2 свиноматки из корпуса № 1 и 5 свиноматок из корпуса № 6. Около 30% поголовья, содержащегося в корпусах № 1 и № 6, отказались от корма.

На СТФ № 1 первые признаки заболевания (вялость, угнетение животных, отказ от корма) были замечены 01.09.2011 г. в группе хрячков, кастрированных 20.08.2011 г. Ветеринарными специалистами фермы было сделано заключение, что это послеоперационное осложнение, так как наблюдали отек и покраснение в области операционных разрезов (см. табл. 1).

На вскрытии у павших животных установлено геморрагическое воспаление слизистых оболочек гортани и трахеи, в бронхах обнаружена пенная жидкость, селезенка увеличена, кровенаполнена, рыхлой

Табл. 1. Динамика падежа по возрастным группам за сентябрь 2011 г.

Дата сентября 2011	СТФ № 1				СТФ № 2			
	Группа 0-2 мес.	Группа 2-4 мес.	свиноматки	откорм	Группа 0-2 мес.	Группа 2-4 мес.	свиноматки	откорм
1					6		1	1
2					2			
3	6				6		1	
4	7		1		14	1		1
5	6				4			2
6	5				6			4
7	3				4		1	1
8	2				3			
9	1				4	2		
10								
11					2	2	1	1
12	5		1					12
13	20				14	13		
14	13		1		1			
15	25		2		2		1	1
16	20		7	1		16	14	1
17							13	4
итого	113		12	1	68	34	32	28

консистенции. Брыжеечные, паховые лимфатические узлы увеличены, кровенаполнены. От павших животных взяты пробы и отправлены в ГБУ КК «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория». По результатам экспертизы № 10675-10678 и № 3045-3048 от 17.09.2011 г. был получен положительный результат на АЧС. А 18.09.2011 г. из ГНУ ВНИИВВиМ г. Покров соглас-

Табл. 2. Выбытие животных с начала 2011 г.

	Падеж			в/убой		
	СТФ № 1	СТФ № 2	СТФ № 3	СТФ № 1	СТФ № 2	СТФ № 3
Январь	111	269	198	236	421	66
Февраль	109	481	250	893	77	158
Март	87	459	232	629	228	437
Апрель	73	480	129	536	297	750
Май	54	236	130	554	838	117
Июнь	103	211	118	629	1020	135
Июль	57	197	248	373	774	396
Август	61	165	249	101	1091	181
Сентябрь до 7.09.2011	278 (126*)	159 (162*)	179	45	1020	118

\* - данные предоставлены госветслужбой

Табл. 3. Реализация свиней в хозяйстве с 29.08.11 по 16.09.11

Дата	Автор реализации	Район	Количество животных			Итого
			СТФ № 1	СТФ № 2	СТФ № 3	
30.08.11	частный предприниматель	Славинский		17		17
01.09.11	частный предприниматель	Тимашевский		88		176
	частный предприниматель	Тимашевский		88		
02.09.11	частный предприниматель	г. Темрюк		40		318
	частный предприниматель	Темрюкский		40		
	частный предприниматель	Славинский		110		
	частный предприниматель	Славинский		110		
	частный предприниматель	Славинский р-н				
05.09.11	частный предприниматель	Темрюкский		42		1016
	частный предприниматель	Крымский		137		
	частный предприниматель	Славинский		20		
	частный предприниматель	Темрюкский		42		
	частный предприниматель	Славинский		18		
	частный предприниматель	Славинский		20		
	частный предприниматель	Славинский		60		
	частный предприниматель	Славинский		45		
ЗАО «Лабинский»	Лабинский		32		600	
07.09.11	частный предприниматель	Славинский		43*		170
	частный предприниматель	Славинский		127		
09.09.11	частный предприниматель	Темрюкский		48		575
	частный предприниматель	г. Темрюк		77		
	частный предприниматель	Славинский		215		
	частный предприниматель	Темрюкский		72		
	частный предприниматель	Славинский		48		
	частный предприниматель	Славинский		71		
	частный предприниматель	Славинский		44		
	ООО «Лиза»	Красноармейский		96		
12.09.11	частный предприниматель	Славинский		18		212
	частный предприниматель	Тимашевский		80		
	частный предприниматель	Славинский		18		
14.09.11	частный предприниматель	Ейский		60		60
15.09.11	частный предприниматель	Ейский		161		161
16.09.11	частный предприниматель	Темрюкский			145	145
Итого			280	2425	253	2958

\* без ветеринарных сопроводительных документов

но экспертизе № 04-06/2683 получено подтверждение о наличии вируса АЧС в хозяйстве.

### III. Противоэпизоотические мероприятия

Главой района подписано Постановление № 284 от 17. 09. 2011 г. «Об установлении ограничительных мероприятий (карантина) по африканской чуме свиней на муниципальное образование района» с планом организационных, ветеринарно-санитарных и хозяйственных мероприятий по ликвидации очага африканской чумы свиней и недопущению распространения инфекции на территории муниципального образования района (рис. 3).

Очагами определена территория СТФ № 1 и № 2 хозяйства Краснодарского края.

Территорией 1 угрожаемой зоны определена территория в радиусе 5 км в пределах административных границ станции.

Территорией 2 угрожаемой зоны определена территория в пределах административных границ муниципального образования районов Краснодарского края.

Из данных табл. 2 видно, что в период с 04.09.11 по 06.09.11 проводился массовый убой свиноголовья СТФ № 2, при среднемесечном убое до 50 гол. в сутки (мощность бойни).

Пробы боенского сырья, хранящиеся в холодильной камере убойного цеха, были направлены в ГБУ КК «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» 20 сентября 2011 г., т.к. имелось предположение, что заболевания животных началось еще до 15 сентября 2011 г. Всего отобрано 270 проб. По результатам экспертизы №10887-11100 от 22.09.11 вышеуказанной лаборатории установлено, что в 9 пробах мяса методом полимеразной цепной реакцией выявлен генетический материал вируса АЧС.

Особо следует подчеркнуть, что в это же время осуществлялась реализация живых свиней (см. табл. 3).

В ходе расследования установлено, что в период с 5.09.2011 по 16.09.2011 заготовкой свиней в данном хозяйстве занимались 21 индивидуальный предприниматель.

### Выводы

1. На основании полученных данных эпизоотического обследования СТФ № 1 и № 2 и результатов лабораторных исследований наиболее вероятным источником заноса вируса АЧС является контаминированный вирусом АЧС объект (мясо, мясoproдукты, транспорт, люди или пищевые отходы).

2. Наиболее вероятным фактором возникновения АЧС на бойне с/х предприятия явился завоз животных для последующего убоя предпринимателями и гражданами с территорий, неблагополучных по АЧС, в том числе с хутора Ленинский Абинского района, где было 07.09.2011 г. установлено заболевание АЧС.

3. Факторами, способствующими возникновению АЧС явились:

– наличие межхозяйственных связей с ранее неблагополучными по заболеванию АЧС территориями (реализация живых свиней индивидуальным предпринимателям, закупка премиксов (схема №1);

– пища, изготовленная в домашних условиях и употреблявшаяся в бытовых помещениях корпусов СТФ № 1 и 2, остатки которой не утилизировались;

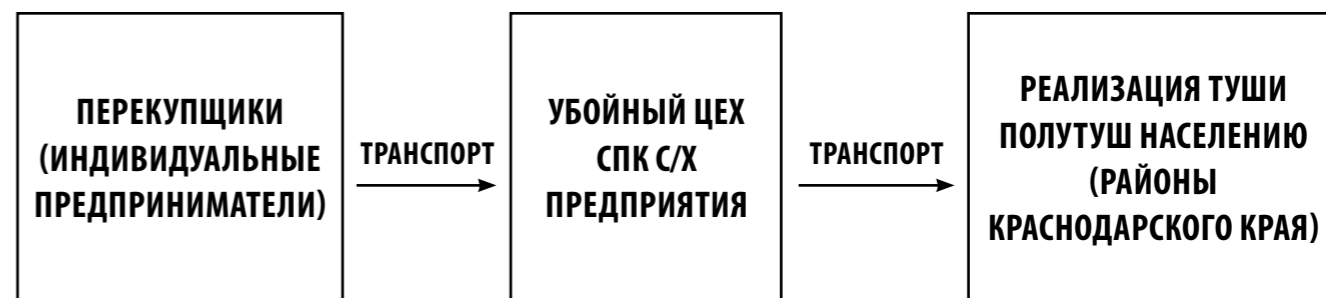


Схема №1

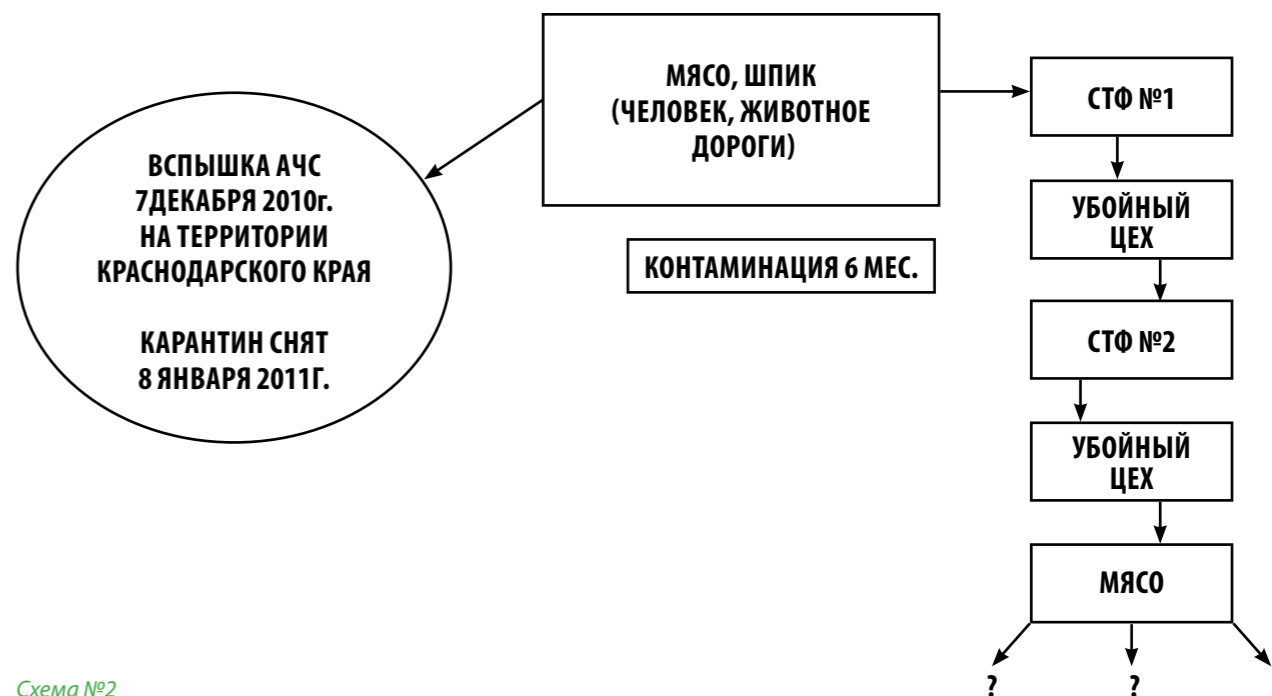


Схема №2

- проникновение на территорию СТФ № 1 и 2 бродячих животных (кошки, собаки);
- недостаточно эффективно проведенные карантинные мероприятия при вспышке АЧС на территории Краснодарского края в декабре 2010 г. (схема №2).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе расследования выявлено, что карантинные мероприятия при вспышке АЧС в декабре 2010 г. были проведены недостаточно эффективно. Четкое и скрупулезное соблюдение всех мер по биобезопасности (качественная работа контрольно-пропускных пунктов предприятия, санпропускников, выполнение ветеринарно-санитарных правил содержания животных, утилизация пищевых отходов и т.д.) может не дать ожидаемого эффекта, если позволить, например, частному предпринимателю «помочь» в процессе убоя животных (схема №1, табл. 2), т.е. воспользоваться транспортом, убойным цехом и иными несертифицированными составляющими процесса утилизации. «На минуточку» заехавшая машина приводит к огромному экономическому ущербу для предприятия и к угрозе для всей свиноводческой отрасли региона, края и страны в целом.

Очевидно, что случай на с/х предприятии никоим образом не связан с распространением заболевания

среди диких кабанов. В ходе расследования выявлен так называемый антропогенный фактор как основной в появлении болезни. Методология, реализованная при эпизоотическом обследовании данного предприятия, должна быть использована при каждом подобном расследовании.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней: утв. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 21 ноября 1980 г. – М., 1980. – 14 с.
- Джупина С.И. Методы эпизоотологического исследования и теория эпизоотического процесса. – Новосибирск: Наука. – Сиб. отделение, 1991. – 142 с.
- Дудников С.А. Количественная эпизоотология: основы прикладной эпидемиологии и биостатистики. // г. Владимир, Демиург, 2004. – 460 с.
- Зуева Л. П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология: Учебник. – СПб: ООО ФОЛИАНТ, 2005. – 52 с.
- Методические указания по ретроспективному анализу эпизоотической ситуации (на примере отчетов об эпизоотической ситуации в Российской Федерации за год/полугодие/квартал) / О.Н. Петрова, Н.С. Бардина, Е.Е. Ерастова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ» – Владимир, 2011. – 51 с.

Автор фотографий: Саввин А.В, старший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ»



UDC: 619:616.98:578.842.1:616-036.22

# EPIDEMIC INVESTIGATION OF AFRICAN SWINE FEVER OUTBREAKS (EVIDENCE FROM THE KRASNODAR KRAI)

A.V. Savvin<sup>1</sup>, O.N. Petrova<sup>2</sup>, N.S. Bardina<sup>3</sup>, S.A. Dudnikov<sup>4</sup>, O.Y. Goryushev<sup>5</sup>, S.G. Remyga<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Senior Researcher of the Information and Analysis Centre; FGBI "ARRIAH", Vladimir, E-mail: savvin@arriah.ru

<sup>2</sup>Head of the Sector for Veterinary Epidemiology of the RF, Information and Analysis Centre; FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>3</sup>Junior Researcher, Information and Analysis Centre; FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>4</sup>Head of the Information and Analysis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine); FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>5</sup>Leading Veterinarian, ASF Reference Laboratory; FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>6</sup>Junior Researcher, ASF Reference Laboratory; FGBI "ARRIAH", Vladimir

## SUMMARY

The paper demonstrates data on African swine fever outbreaks in the Krasnodar Krai. Epidemic investigation technique is given in detail as well.

**Key words:** African swine fever, outbreak, epidemic investigation.

## INTRODUCTION

African swine fever (Montgomery's disease, ASF) has been wide spread in the territory of the Russian Federation. South and North-Caucasian Federal Okrug can be considered ASF endemic regions. Both domestic and wild pigs are in vivo susceptible to the disease. The infection occurs during the contact of healthy animals with the diseased ones. The disease is highly dangerous for pig population as it does not respond to treatment and vaccine prevention.



Fig. 1. Culling of animals

## MATERIALS AND METHODS

Data of epidemic investigation of the ASF outbreaks in the Krasnodar Krai (Staroscherbinovskaya vallage of the rayon) are represented in the paper.

The data were statistically processed using standard Microsoft Excel software and retrospective analysis tools [5]. Spatial analysis is performed using GIS-ESRI software.

## RESULTS AND DISCUSSION

Need for detailed and rigorous examination of any ASF case is a regulated responsibility of relative authorities and it is mostly dependant both on the disease itself as it is included in the hypothetical group of "highly dangerous" diseases and current emergency situation in the country [1].

*Basic properties of the ASF epidemic situation in the region*

Official statistics (final data from the FGBI "Veterinary Center" as of November 16, 2011) and immediate field information indicate aggravation of the ASF situation in the Krasnodar Krai.

By the end of 2010, 24 ASF outbreaks had been reported in the territory of the region. They included 12 outbreaks in wild boars (see the Fig. 2). Almost all disease cases in wild boars were reported in high-mountainous area in the south of the region. ASF outbreaks in pigs in backyards and on farms of different ownership types (n = 12) were limited to eastern and northern areas of the region. 100-km risk zone covered almost the whole region.



Fig. 2. ASF outbreaks in the Krasnodar Krai, 2008-2011

New wave of the disease was reported in 2011.

As of November 16, 2011, 18 disease outbreaks were reported, the majority of which occurred in various farms (see the Figure). Total pig population in the affected sites amounted to 59924 animals, number of diseased animals – 514, dead animals – 301. In each outbreak site quarantine was imposed and adequate measures were taken. ASF epidemic situation in the Krasnodar Krai as of November 16, 2011 could be described as "critical".

**Table 1. Mortality by age groups. September 2011**

date of september, 2011	PPF No.1				PPF No.2			
	0-2 month-old	2-4 month-old	saws	Fat-tening pigs	0-2 month-old	2-4 month-old	saws	fat-tening pigs
1					6		1	1
2					2			
3	6				6		1	
4	7		1		14	1		1
5	6				4			2
6	5				6			4
7	3				4		1	1
8	2				3			
9	1				4	2		
10								
11					2	2	1	1
12	5		1					12
13	20				14	13		
14	13		1		1			
15	25		2		2		1	1
16	20		7	1		16	14	1
17							13	4
итого	113		12	1	68	34	32	28

**Table 2. Loss of animals starting from the beginning of 2011**

Month	Mortality			Emergently slaughtered		
	PPF No.1	PPF No.2	PPF No.3	PPF No.1	PPF No.2	PPF No.3
January	111	269	198	236	421	66
February	109	481	250	893	77	158
March	87	459	232	629	228	437
April	73	480	129	536	297	750
May	54	236	130	554	838	117
June	103	211	118	629	1020	135
July	57	197	248	373	774	396
August	61	165	249	101	1091	181
Before September 17, 2011	278 (126*)	159 (162*)	179	45	1020	118

\* - data are submitted by the State Veterinary Service

*Epidemic investigation during epidemic survey of a farm*

Success of measures implemented for ASF outbreak eradication is guaranteed in case of epidemiological investigation. Under such investigation aims and objectives should be determined as well as action plan should be developed. The investigation results become the basis for the plan of antiepidemic measures, which is implemented by relative bodies.

Epidemic analysis includes specific tools and techniques: comparative historical and geographical characterization, epidemic survey and experiment. Mathematical analysis of the data allows for refinement and systematization of the obtained data. Methodologically competent epidemic investigation of the outbreak on a farm or in a backyard results in identification of the main factor of the outbreak development [3, 4].

Efficiency of measures aimed at prevention of possible disease introduction onto a farm was examined basing

on the evidence from the epidemic survey and analysis of the animal health measures implemented in the ASF outbreak site in the agricultural production cooperative APC (Staroborshevskaya village of the Krasnodar Krai). Efforts for selection of the basic risk factor for the disease occurrence in a farm were also taken.

**I. FARM SPECIFICATIONS**

Specification and geographical position of the pig production farms (PPF) No. 1 and No. 2 of the APC. The main areas of the cooperative's business activities are plant production, dairy cattle breeding and pig production. The territory of the PPF No.1 is fenced with a concrete barrier with a sheltered vehicle disinfecting channel at the entrance. All entering vehicles are registered in the entry logbook. The staff number on the PPF No.1 amounts to 43 people and on the PPF No. 2 – 90 people. Shower and changing facilities are provided. Pig population on the backyards of the staff-members of PPFs No. 1 and No.2 is strictly controlled. No burial sites or biothermal pits were detected in the PPFs' area of the APC. Biological wastes are disposed by incineration in the area of PPFs No. 1 and No. 2.

The pig population is housed in 11 buildings on each farm. There is a feed-processing building and feed storage. There are hard ground covered access roads. PPFs No. 1 and No. 2 of the APC are fully staffed with the veterinarians. Biomaterials are routinely screened for ASF freedom in the Governmental Budgetary Institution of the Krasnodar Krai (GBI KK) "Kropotkin Regional Veterinary Laboratory".

**II. EPIDEMIC DEVELOPMENT**

First disease signs (diarrhea, vomiting, staggering gait, anorexia, hyperthermia up to 41°C) were reported in sows in buildings No. 1 and No.6 of PPF No. 2. Over the night of September 15/16, 2011 five sows died in Building No. 1 and two sows died in building No. 6. During the day (September 16) two more sows died in Building No. 1 and five sows – in Building No.6. About 30% of the pig population kept in Buildings Nos. 1 and 6 demonstrated anorexia.

On the PPF No. 1 the first disease signs (apathy, depression, anorexia) were initially reported on September 1, 2011 in a group young hogs castrated on August 20, 2011. The farm veterinarians considered the signs to be postsurgical complications as edema and hyperemia were observed in the region of surgical incisions.

Post mortem examination of dead animals demonstrated hemorrhagic inflammation of larynx and trachea mucosa, foamy fluid in bronchi, enlarged, engorged and friable spleen. Mesenteric and inguinal lymphatic nodes were enlarged and engorged. Samples were collected from dead animals and sent to GBI KK Kropotkin Regional Veterinary Laboratory. Tests No. 10675-10678 and No. 3045-3048 performed on September 17, 2011 demonstrated positive ASF results. Test No. 04-06/2683 performed on September 18, 2011 in the SRI NRIVaMR (Pokrov) confirmed the ASF virus circulation on the farm.

**III. ANTI-EPIDEMIC MEASURES**

Head of the rayon signed Regulation signed Regulation No. 284 as of September 17, 2011 "African swine fever containment measures (quarantine) in the rayon, which included plan of organizational, animal health and

managerial arrangements for ASF outbreak eradication and prevention of the infection spread in the territory of the rayon.

The outbreak sites were determined as PPF No. 1 and 2 of the APC of the rayon.

5 km radius Risk zone 2 lied within the perimeter of the rayon.

Risk zone 2 lied within the perimeter of the rayon.

Table 2 demonstrates that during the period from September 04, 2011 to September 06, 2011 mass slaughter of pigs was performed on PPF No. 2 with an average monthly slaughter of 50 animals per day (slaughter house capacity).

Samples of slaughter material cold stored in the slaughter unit were sent to the GBI KK Kropotkin Regional Veterinary Laboratory on September 20, 2011, as the disease was supposed to start before September 15, 2011. Total of 270 samples were collected. PCR tests No. 10887-11100 as of September 22, 2011 demonstrated that 9 meat samples contained the ASF virus genetic material.

Particular emphasis should be given to the fact that live animals were concurrently resold (Table 3).

The investigation results demonstrated that during the period from September 5, 2011 to September 16, 2011, 21 individual entrepreneurs purchased pigs from the farm for further marketing.

**V. OUTCOMES**

1. In view of the evidence of the epidemic investigation of the PPF No. 1 and No. 2 of the APC as well as in view of the laboratory test results, ASF virus introduction source is most likely to be an ASF contaminated item (meat, meat products, vehicle, people or swill).

2. The most probable factor of ASF occurrence in the slaughter unit is introduction of animals from ASF affected areas including Leninsky farm yard of the Abinsky Rayon, where ASF was confirmed on September 07, 2009.

3. Factors aiding to ASF occurrence in APC are the following:

- Interfarm relations with previously ASF affected areas (selling of live pigs to individual entrepreneurs, premix procurements) (Diagram No.1);

- Home-cooked food consumed in welfare rooms of the units in PPF No. 1 and No. 2 of APC. The residues of such food were not disposed;

- Intrusions by stray animals (cats, dogs) into the territory of the PPF No. 1 and No. 2;

- Insufficiently effective quarantine measures taken during ASF outbreak in the rayon in December, 2010 (Diagram No. 2).

**CONCLUSION**

Investigation results demonstrated that quarantine measures taken during the ASF outbreak in December 2010 were not efficient enough. Concise and rigorous compliance with all biosafety rules (good performance of the entry checkpoints, shower and changing facilities, compliance with the animal keeping rules, disposal of swills, etc) can fail to provide expected results in case someone (e.g. individual entrepreneur) is allowed to "help" during animal slaughter, i.e. it is allowed to use transport, slaughter facilities or other non-approved components of the disposal procedure. A "stopped-by" vehicle can cause great economic losses for the farm and induce risk for the whole pig production industry of the region, krai and the whole country.

**Table 3. Marketing of pigs from APC. August 29, 2011 – September 16, 2011**

Data	Marketed by	Rayon	Number of animals			Total	
			PPF No. 1	PPF No. 2	PPF No. 3		
30.08.11	individual entrepreneur	Slavinsky		17		17	
01.09.11	individual entrepreneur	Timashevsky		88		176	
	individual entrepreneur	Timashevsky		88			
02.09.11	individual entrepreneur	Temryuk town		40		318	
	individual entrepreneur	Temryuksky		40			
	individual entrepreneur	Slavinsky	110				
	individual entrepreneur	Slavinsky	110				
05.09.11	individual entrepreneur	Temryuksky		42		1016	
	individual entrepreneur	Krymsky		137			
	individual entrepreneur	Slavinsky		20			
	individual entrepreneur	Temryuksky		42			
	individual entrepreneur	Slavinsky		18			
	individual entrepreneur	Slavinsky		20			
	individual entrepreneur	Slavinsky		60			
	individual entrepreneur	Slavinsky		45			
	individual entrepreneur	Slavinsky		32			
	individual entrepreneur	ZAO "Labinsky"	Labinsky		600		
07.09.11	individual entrepreneur	Slavinsky		43*		170	
	individual entrepreneur	Slavinsky		127			
09.09.11	individual entrepreneur	Temryuksky		48		575	
	individual entrepreneur	Temryuk town		77			
	individual entrepreneur	Slavinsky		215			
	individual entrepreneur	Temryuksky		72			
	individual entrepreneur	Slavinsky		48			
12.09.11	individual entrepreneur	Slavinsky		71		212	
	individual entrepreneur	Slavinsky		44			
	individual entrepreneur	000 "Liza"	Krasnoarmeysky		96		
	individual entrepreneur	Slavinsky		18			
14.09.11	individual entrepreneur	Timashevsky		80		60	
	individual entrepreneur	Slavinsky		18			
14.09.11	individual entrepreneur	Yeysky	60			60	
15.09.11	individual entrepreneur	Yeysky		161		161	
16.09.11	individual entrepreneur	Temryuksky			145	145	
Total			280	2425	253	2958	

\* without accompanying veterinary documentation

It is evident that the disease in ACP has no relation to the disease spread in wild boars. During the investigation the so called antropogenic factor was identified as a basic one for the disease emergence. The technique used for epidemic investigation of the above mentioned farm should be used for each similar investigation.

**REFERENCES**

- Guidelines on measures for African swine fever prevention and eradication: approved by the Central Veterinary Administration of the USSR Ministry of Agriculture on November 21, 1980 – M., 1980. – 14 p.
- Dzhupina S.I. Tools for epidemic investigation and theory of epidemic process. – Novosibirsk: Nauka. – Siberian branch, 1991. – 142 p.



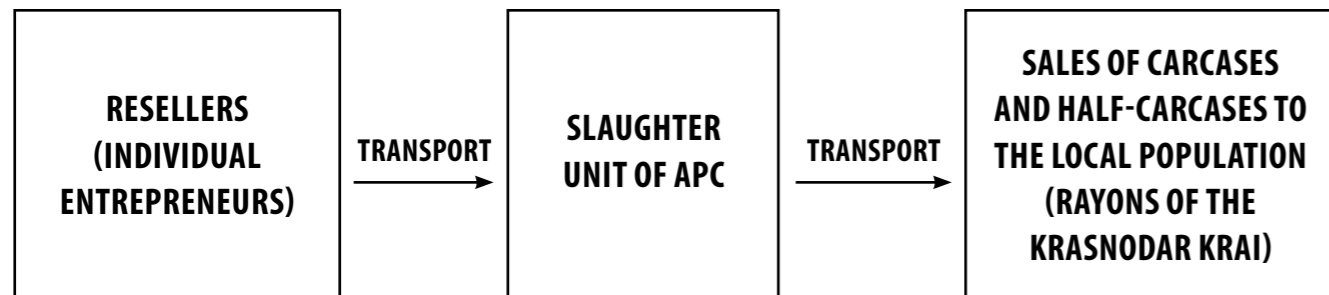


Diagram No. 1

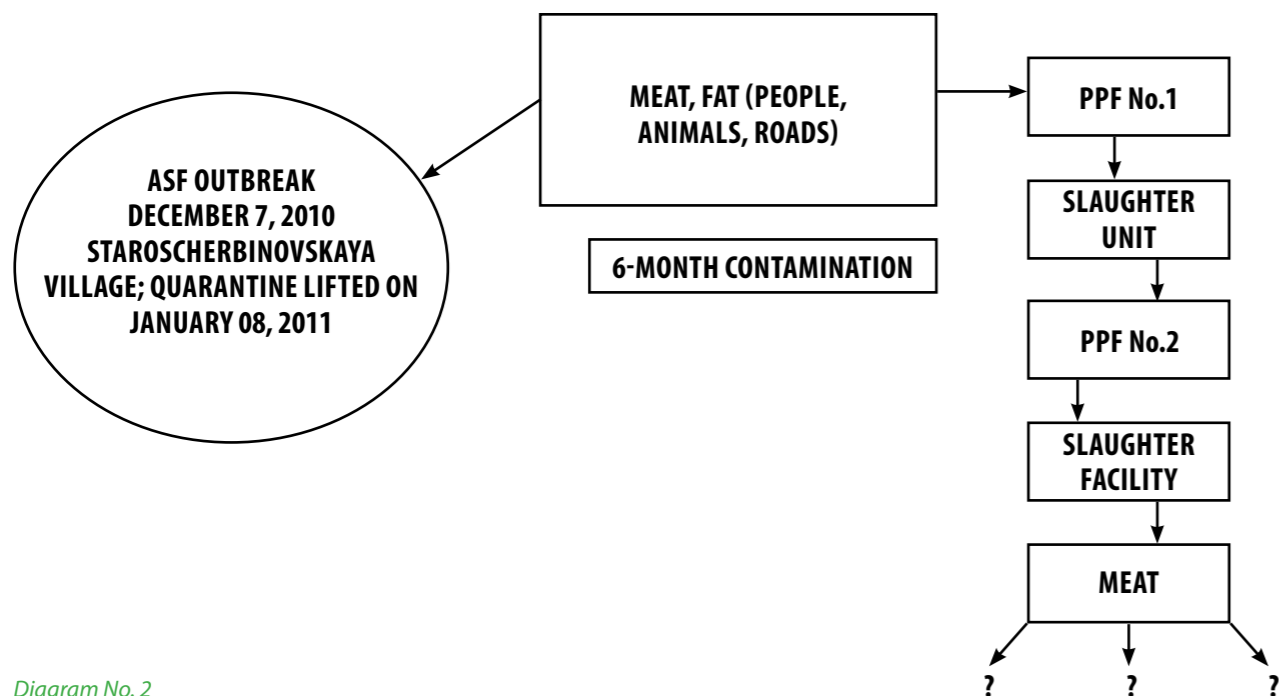


Diagram No. 2

3. Dudnikov S.A. Quantitative epidemiology: basics for applied epidemiology and biostatistics. – Vladimir: Demurg, 2004. – 460 p.

4. Zueva L.P., Yafayev R.Kh. Epidemiology: manual. – SPb: OOO FOLIANT, 2005. – 752 p.

5. Recommended practices of retrospective analysis of epidemic situation (evidence from the reports on epidemic situation in the Russian Federation for a year/six month/three month period) / O.N. Petrova, N.S. Bardina, E.E. Yerastova [et al]; FGBI "ARRIAH". – Vladimir, 2011. – 51 p.

УДК 619:616.98:578.824.11(470.314)

# РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЭПИЗОТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БЕШЕНСТВУ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

А.В. Бельчихина<sup>1</sup>, М.А. Шибяев<sup>2</sup>, С.А. Дудников<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир;

<sup>3</sup> заведующий Информационно-аналитическим центром Управления ветнадзора, кандидат ветеринарных наук, доцент; ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

## РЕЗЮМЕ

В работе представлен ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Владимирской области в период с 2005 по 2011 гг. Данный анализ, в первую очередь, целесообразно учитывать ветеринарной службе области при разработке профилактических мероприятий, направленных на снижение риска возникновения заболевания, без излишнего распыления средств и усилий.

**Ключевые слова:** бешенство, эпизоотическая ситуация, ретроспективный анализ, Владимирская область.

## ВВЕДЕНИЕ

В мире на современном этапе наблюдается рост рабической инфекции, такая же закономерность отмечается и в Российской Федерации (РФ). Число случаев бешенства, регистрируемых у животных (лисица, енотовидная собака, волк, собака, кошка и крупный рогатый скот) в РФ, имеет тенденцию к росту со средним темпом 10% ежегодно [3]. В течение 12 месяцев 2011 г. в РФ было зарегистрировано 2751 неблагополучных пункта, заболело и пало 3188 голов животных, из которых дикие животные – 1539, домашние плотоядные животные (собаки и кошки) – 1054 и сельскохозяйственные животные – 402 [4].

В 2011 г. случаи бешенства животных регистрировались в 62 субъектах страны. Наиболее неблагополучные регионы по данному заболеванию находятся в Приволжском и Уральском федеральных округах РФ [2, 3]. В Центральном регионе также в последние годы отмечается ухудшение эпизоотической обстановки по бешенству, остается нестабильной ситуация по рабической инфекции и на территории Владимирской области [1, 4].

Учитывая напряженную эпизоотологическую обстановку и социальные аспекты бешенства, а также не всегда и не до конца изученную природу возник-

новения и существования очагов бешенства и в связи со сложностью вопроса относительно резервуара инфекции, нам представляется целесообразным проведение ретроспективного анализа эпизоотической ситуации по бешенству среди животных на территории Владимирской области.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При анализе эпизоотической ситуации по бешенству на территории Владимирской области использовались данные, представленные Департаментом ветеринарии администрации Владимирской области, Владимирской областной ветеринарной лабораторией и ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ИАЦ Россельхознадзора, г. Владимир).

Для определения территориально-географической привязки случаев бешенства к карте применялась поисковая система Google Earth Pro и электронные карты России (ИНГИТ). Визуализация полученных координат выполнена с помощью программы GIS ArcMap 9.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Неблагополучные по бешенству территории Владимирской области*

Эпизоотическая ситуация по бешенству на территории районов Владимирской области остается нестабильной. За период наблюдения с 2005 по 2011 гг. зарегистрировано 241 неблагополучный пункт (н.п.) по рабической инфекции с различной степенью распространения по районам Владимирской области. В 2005 г. н.п. по бешенству были зарегистрированы в 10 районах области (Александровском, Гусь-Хрустальном, Киржачском, Кольчугинском, Меленковском, Муромском, Петушинском, Суздальском и Юрьев-Польском), а к 2009 г. отмечено расширение ареала болезни по всей территории Владимирской области (рис. 1–2).

Количественное распределение случаев бешенства в районах Владимирской области (2005–2011 гг.)

## Число случаев бешенства по районам Владимирской области в период с 2005 по 2011 гг.

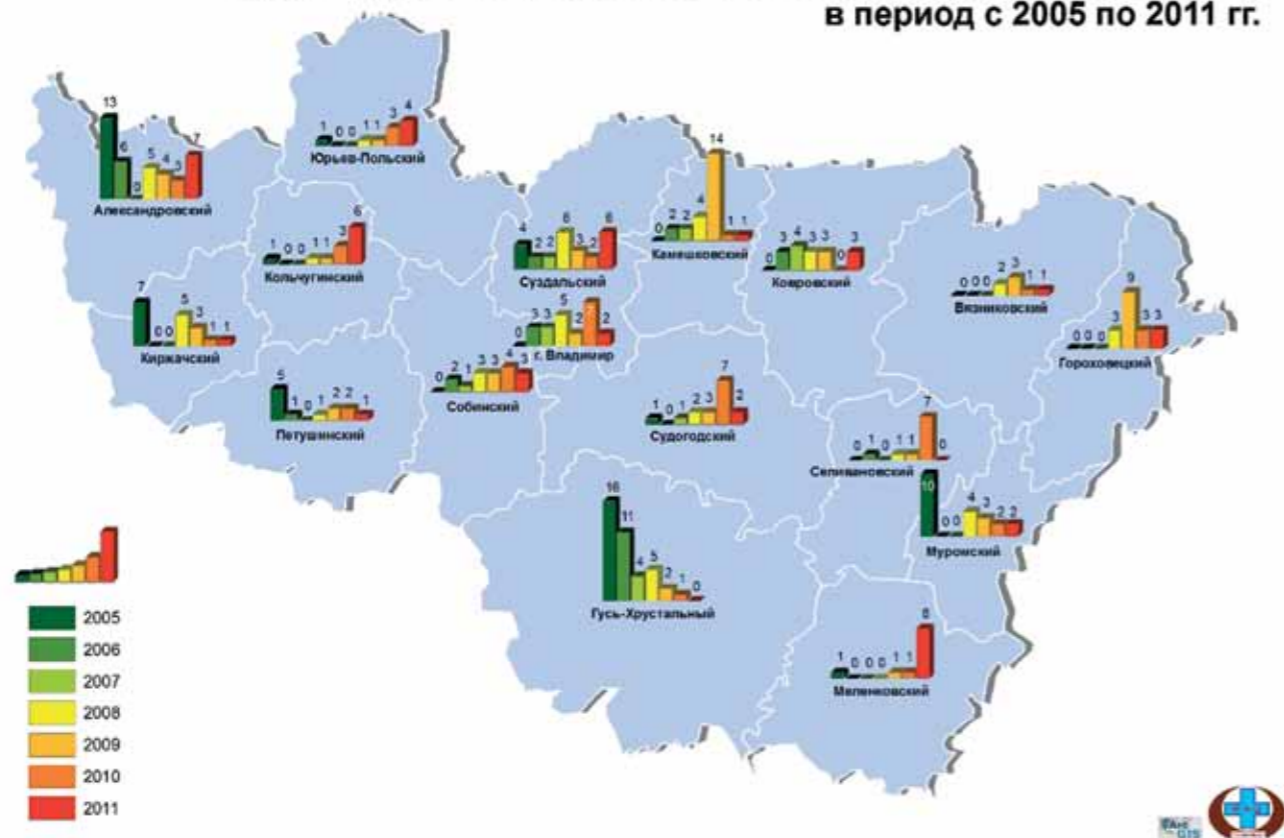


Рис. 1. Неблагополучные по бешенству территории Владимирской области в период с 2005 по 2011 гг.



Рис. 2. Географическое распространение случаев бешенства на территории Владимирской области (2005–2011 гг.)

за указанный период неравномерно. Наибольшее их число было отмечено в Гусь-Хрустальном (39), Александровском (38), Суздальском и Камешковском (25) районах и в г. Владимире (22), наименьшее – в Вязниковском (7) районе (рис. 1–2).

В течение 12 месяцев 2011 г. на территории Владимирской области было зарегистрировано 45 н.п. (50 случаев) бешенства у животных. Неблагополучие по данному заболеванию отмечалось в 14 из 16 районов субъекта и областном центре. Исключение составляют Гусь-Хрустальный и Селивановский районы.

Наибольшее число н.п. фиксировалось в Александровском (6), Кольчугинском (6), Суздальском (6) и Меленковском (5) районах. Лидерами же по количеству случаев бешенства в области за 2011 г. являлись Александровский (7) и Меленковский (8) районы. В последней ситуации значительно усугубилась после относительного благополучия на протяжении последних шести лет. Напротив, в Гусь-Хрустальном районе количество случаев сокращается с каждым годом: с 16 в 2005 г. до их отсутствия в 2011 г.

Кроме этого, ситуация продолжает ухудшаться на юго-западе и востоке области, а именно, в Александровском, Юрьев-Польском и Гороховецком районах, то есть в районах граничащих с Московской, Ярославской и Нижегородской областями, в которых также отмечается стойкое неблагополучие по бешенству. В частности, за 2011 г. в Московской, Ярославской и Нижегородской областях зарегистрировано – 236, 61 и 32 н.п. по бешенству, соответственно.

Все случаи бешенства, зарегистрированные на территории районов области за период с 2005 по 2011 гг., были географически привязаны к месту их регистрации по базе данных соответствующих координат (рис. 2).

Из наглядно представленных на рис. 3 данных видно, что ситуация в областном центре не столь однозначна. С 2006 по 2011 гг. заболевание в городской черте фиксировалось ежегодно (от 2 до 7 случаев в год). При этом из 22 случаев за рассматриваемый период с дикими животными (лисы) связано всего 4 случая (18%). Более того, внутри городской черты зарегистрирован всего один такой случай (2008 г.), а остальные же случаи (3) находятся на расстоянии более 3 км от г. Владимир.

Обращает на себя внимание кластеризация заболевания в городской черте: один кластер сформирован

в юго-западной части города (8 случаев бешенства – 36%), второй – в восточной части (4 случая бешенства – 18%), и третий – в центральном массиве города (6 случаев бешенства – 27%). Первые два кластера неблагополучия расположены преимущественно в районах города, заполненных в основном малоэтажным частным сектором с примыкающими к ним приусадебными участками и садами – местами преимущественного скопления и обитания безнадзорных, бродячих и одичавших собак и кошек. Третий кластер неблагополучия находится в зоне, где сосредоточены перерабатывающие предприятия и гаражные массивы, в которых также отмечается высокая плотность кошек и собак, ведущих уличный образ жизни.

### Видовая структура бешенства на территории Владимирской области

Анализ видовой структуры заболеваемости бешенством во Владимирской области (рис. 4) показывает, что среди диких животных наблюдается превалирование лисьего бешенства – 85% (142 случая), на долю енотовидной собаки и волка приходится 10% (16 случаев) и 1% (2 случая), соответственно.

Также следует отметить, что в поддержании природного очага бешенства на территории области в эпизоотологическую цепь вовлечены дикие животные семейства кунных. В частности, за анализируемый период бешенство было диагностировано у куницы (1 случай), барсука (1 случай) и хорьков (3 случая).

Случаи лабораторной диагностики рабической инфекции у бобра и ондатры (по 1 случаю) представляются особо интересными в плане понимания их роли и места в эпизоотологическом процессе бешенства.

Анализируя видовой состав домашних плотоядных животных обитающих на территории области, у которых регистрировалась рабическая инфекция, выявили, что 74 случая (53%) приходится на долю собак



Рис. 3. Географическое распространение случаев бешенства на территории г. Владимира и в его окрестностях (2006–2011 гг.)

и 63 случая (46%) – на кошек. В областном центре это распределение составило 45% на кошек и 27% на собак (рис. 4). Выявленные факты указывают на необходимость регуляции численности уличных животных и иммунизации данных видов животных.

Изучая динамику случаев бешенства в популяциях диких и домашних плотоядных животных за период с 2005 г. по 2011 г. (рис. 5) выявили, что годовые колебания числа случаев рабической инфекции у данных групп животных в определенной степени взаимосвязаны (коэффициент корреляции = 0,61). А взаимосвязь между количеством случаев среди лис прямо коррелирует с количеством случаев у диких животных ( $r=0,99$ ). При этом на лис приходится 85% случа-

Табл. 1. Расчет плотности лис, подлежащих истреблению на территории районов Владимирской области для достижения подпорогового уровня плотности популяции

Название района	Площадь (км <sup>2</sup> )	Численность лис (гол.) за 2011 г.	Плотность лис (гол./1 км <sup>2</sup> )	% лис для истребления	Количество лис к истреблению (гол.)	Плотность лис после истребления (гол./1 км <sup>2</sup> )
Александровский	1520,9	702	0,46	0,6	324	0,24
Вязниковский	1897,5	322	0,16	–	–	–
Гороховецкий	960,7	147	0,15	–	–	–
Гусь-Хрустальный	3019,7	442	0,14	–	–	–
Камешковский	973,2	187	0,19	–	–	–
Киржачский	987,8	206	0,2	–	–	–
Ковровский	1532,8	515	0,33	0,2	173	0,22
Кольчугинский	1005,9	208	0,2	–	–	–
Меленковский	1773,7	424	0,23	–	–	–
Муромский	996,4	205	0,2	–	–	–
Петушинский	1390,6	263	0,18	–	–	–
Селивановский	1052,6	217	0,2	–	–	–
Собинский	1625,9	226	0,13	–	–	–
Судогодский	1783,7	210	0,11	–	–	–
Суздальский	1529,2	150	0,09	–	–	–
Юрьев-Польский	1818,8	560	0,3	0,07	172	0,21
Итого	23869,4	4984	0,2	–	669	0,18

■ популяция лис, находящая выше порогового показателя (0,2 гол./км<sup>2</sup>);  
■ популяция лис, находящая на пороговом значении (0,2 гол./км<sup>2</sup>).

## Распределение случаев бешенства во Владимирской области по видам животных с 2005 по 2011 гг.

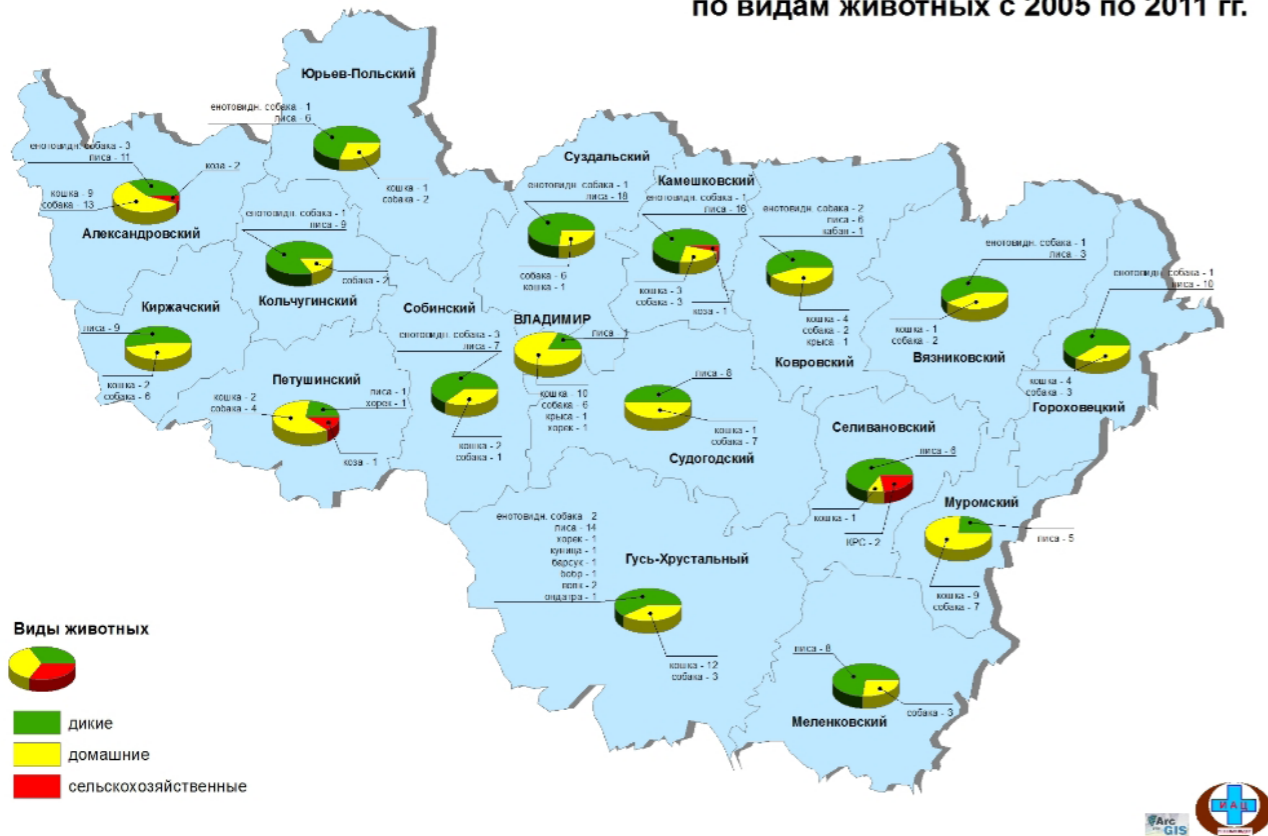


Рис. 4. Распределение видовой структуры бешенства на территории Владимирской области за весь период с 2005 по 2011 гг.

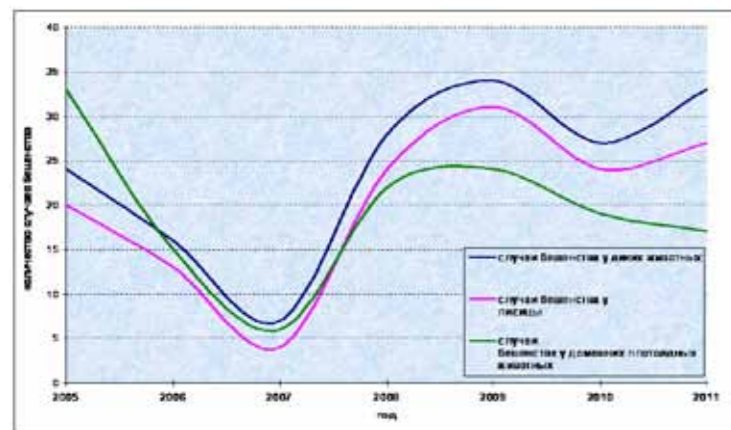


Рис. 5. Динамика случаев бешенства в популяции диких, домашних животных и лис (2005–2011 гг.)

ев заболеваемости за данный период. Также выявлена выраженная зависимость колебаний случаев болезни у лис от численности их популяции, обитающей на территории Владимирской области, в 2008–2011 гг. ( $r=0,95$ ).

Для снижения заболеваемости бешенством на территории области, ввиду положительной корреляции случаев у лис и других диких животных, а также положительной связи размера популяции лис и заболеваемости, помимо вакцинации диких животных, стоит применять и мероприятия, направленные на сни-

жение численности лис, как один из методов борьбы с бешенством. При этом следует учитывать, что для прекращения циркуляции вируса необходимо уменьшить плотность популяции лисиц до порогового показателя – не более 0,2 гол./км<sup>2</sup> [2].

В 2011 г. плотность популяции лис на территории отдельных районов области была различной (табл. 1).

В табл. 1 представлен расчёт процента лисиц, подлежащих истреблению на территории районов области для достижения подпорогового уровня плотности популяции [2]. При этом использовано базовое уравнение (по Anderson et al., 1981 г.):

$$p > 1 - 1/(K - KT)$$

где  $p$  – процент лисиц подлежащих истреблению;  
 $K$  – существующая плотность популяции;  
 $KT$  – пороговая плотность популяции (0,2 гол./км<sup>2</sup>).

Как видно из данных табл. 1, регуляции численности подлежит популяция лис на территории трёх районов области (Александровский, Ковровский и Юрьев-Польский). При этом особое внимание также следует уделить Киржачскому, Кольчугинскому, Муромскому, Меленковскому и Селивановскому районам, численность популяций лис в которых находится на пороговых значениях, ввиду того, что в табл. 1 приведены показатели плотности популяций лисиц, рассчитанные с использованием данных зимнего маршрутного учета (ЗМУ). В зимний период возрастание естественной смертности и промысла лис ведёт к временному сокращению популяции. Осенью же, после перехода

молодняка к самостоятельному образу жизни этот показатель бывает втрое выше, при этом пропорционально увеличивается и число лис, подлежащих истреблению [2].

Также необходимо отметить тот факт, что наряду с увеличением числа случаев бешенства наблюдается параллельный рост проводимых диагностических исследований по заболеванию.

Как видно из результатов, представленных в табл. 2, для диких животных коэффициент корреляции крайне высок и достигает 0,96, что косвенно указывает на инцидентную диагностику, т.е. клинически подозрительных животных исследуют лабораторными методами. Для домашних плотоядных животных этот коэффициент значительно ниже (0,54), а в целом по области коэффициент корреляции для количества исследований и числа положительных диагнозов достигает 0,76, что свидетельствует об эндемичности бешенства.

Поэтому полученные результаты диагностических исследований не отражают реальной картины заболеваемости бешенством в популяции, так как исследуются заведомо больные (или вероятно больные) животные, а значит реальная превалентность заболевания находится на более высоком уровне. Иначе говоря, диагностика носит преимущественно инцидентный характер.

### ВЫВОДЫ

На данный момент ситуация по рабической инфекции в большинстве районов Владимирской области остается напряженной.

За период с 2005 по 2011 гг. зарегистрирован 241 н.п. по бешенству с различной степенью распространения по районам Владимирской области. Неблагополучие по данному заболеванию в 2011 г. отмечалось в 14 (выявлено 45 н.п.) из 16 районов субъекта и в областном центре (выявлено 2 н.п.), а наибольшее число н.п. фиксируется в Александровском, Кольчугинском, Суздальском и Меленковском районах области.

Наибольшее число случаев бешенства во Владимирской области за период с 2005 по 2011 гг. отмечается среди диких животных – 169 (54%), за которыми

следуют домашние плотоядные животные – 135 (44%), а доля сельскохозяйственных животных составляет всего лишь 2%. При этом среди диких животных наблюдается преобладание лисьего бешенства, а у домашних животных количество случаев бешенства распределено практически в равных соотношениях среди кошек и собак.

Для снижения заболеваемости бешенством у животных на территории области, помимо вакцинации диких и домашних, стоит применять и мероприятия, направленные на снижение численности лис (как один из методов борьбы с бешенством). В наибольшей степени это относится к популяции лис, обитающих на территории Александровского, Ковровского и Юрьев-Польского районов.

Диагностика бешенства носит инцидентный характер, особенно среди диких животных.

Полученные результаты анализа в первую очередь нужно учитывать ветеринарной службе области при разработке мероприятий по ветеринарному надзору, мониторингу, контролю, наблюдению за эпизоотическим состоянием при бешенстве.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бешенство во Владимирской области: эпизоотологическая география с картографией: информ. аналит. бюллетень / А.В. Бельчихина, М.В. Дудорова, М.А. Шибачев, С.А. Дудников. – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2011. – 46 с.
2. Бешенство на юге Западной Сибири в 1990–2000 гг.: вопросы и поиск решения / И.В. Кузьмин, Г.Н. Сидоров, А.Д. Ботвинкин [и др.] // Ветеринарная патология. – 2001. – № 1. – С. 92–100.
3. О заболеваемости бешенством в Российской Федерации – URL: [http://www.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic\\_situation/15934/](http://www.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/15934/) (дата обращения: 04.04.2012).
4. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации 2011 г. – URL: [http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2011/files/iac2011\\_12mes.pdf](http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2011/files/iac2011_12mes.pdf) (дата обращения: 04.04.2012).

Табл. 2. Количество диагностических исследований и случаев позитивной диагностики на бешенство по двум популяциям во Владимирской области (2005–2011 гг.)

Годы	КОЛИЧЕСТВО ИССЛЕДОВАННЫХ ПРОБ								
	всего исследовано проб (шт.)			в том числе от домашних плотоядных животных (шт.)			в том числе от диких животных (шт.)		
	всего	из них положительно	$r^*$	всего	из них положительно	$r^*$	всего	из них положительно	$r^*$
2005	89	57		57	32		32	25	
2006	68	31		41	14		27	17	
2007	57	17		38	10		19	7	
2008	71	48	0,76	35	22	0,40	36	26	0,96
2009	116	56		68	22		48	34	
2010	94	46		52	19		42	27	
2011	110	50		64	17		46	33	

$r^*$  – коэффициент корреляции

# RETROSPECTIVE ANALYSIS OF RABIES EPIDEMIC SITUATION IN THE VLADIMIR OBLAST

A.V. Belchikhina<sup>1</sup>, M.A. Shibayev<sup>2</sup>, S.A. Dudnikov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: belchikhina@arriah.ru

<sup>2</sup>Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

<sup>3</sup>Head of the Information and Analytical Centre of the Administration of Veterinary Surveillance, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir

## SUMMARY

The paper presents retrospective analysis of rabies epidemic situation in the territory of the Vladimir Oblast from 2005 to 2011. This analysis will be useful for the Oblast Veterinary Service in the development of preventive measures aimed at the decrease of the disease risk without the unnecessary wasting resources and efforts.

Key words: rabies, epidemic situation, retrospective analysis, Vladimir Oblast

## INTRODUCTION

Currently, the increased incidence of rabies is observed in the world; the same is true for the Russian Federation (RF). The disease incidence reported in animals (foxes, raccoons, wolves, dogs, cats and cattle) in the RF tends to increase 10% each year [3]. Two thousand seven hundred and fifty-one affected settlements were recorded during 12 months of 2011; 3,188 animals were infected and died including 1,539 wild animals, 1,054 domestic carnivores (dogs and cats) and 402 farm animals [4].

In 2011 cases of rabies infection were registered in 62 Subjects of the country. The majority of rabies affected regions are located in the Volga and Ural Federal Okrugs of the RF [2, 3]. Deterioration of rabies epidemic situation has recently been reported in the Central Federal Okrug and in particular in the territory of the Vladimir Oblast [1, 4].

Taking into account the severe epidemic situation and rabies-associated social aspects, as well as not always and not comprehensively studied nature of occurrence and persistence of rabies outbreaks and in view of the complicatedness of reservoir infection issue, we consider reasonable to perform a retrospective analysis of rabies epidemic situation in the territory of the Vladimir Oblast.

## MATERIALS AND METHODS

Analysis of rabies epidemic situation in the territory of the Vladimir Oblast involved data provided by the Veterinary Department of the Vladimir Oblast Administration, Vladimir Oblast Veterinary Laboratory and FGBI "ARRIAH" (IAC of the Rosselkhoz nadzor, Vladimir)

In order to determine the geographical distribution of rabies cases Google Earth Pro and electronic maps of Russia (INGIT) were used. The coordinates obtained were visualized using GIS ArcMap 9.3 software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Rabies-affected regions of the Vladimir Oblast

Rabies epidemic situation in rayons of the Vladimir Oblast remains unstable. During the period of observation from 2005 to 2011 two hundred and forty-one rabies affected settlements were recorded with the different degree of spread in rayons of the Vladimir Oblast. In 2005 rabies affected settlements were reported in 10 rayons of the Oblast (Alexandrovsky, Gus-Khrustalny, Kirzhachsky, Kolchuginsky, Melenkovsky, Muromsky, Petushinsky, Suzdalsky and Yuryev-Polsky), and by 2009 the disease areal expansion had been reported in the whole territory of the Vladimir Oblast (Fig. 1-2).

Quantitative distribution of rabies cases in rayons of the Vladimir Oblast (2005-2011) was non-uniform during the abovementioned period. The majority of cases were reported in Gus-Khrustalny (39), Alexandrovsky (38), Suzdalsky and Kameshkovsky (25) Rayons and in Vladimir, and the minority – in the Vyaznikovsky (7) Rayon (Figures 1-2).

Forty-five affected settlements (50 cases of rabies) were recorded in the territory of the Vladimir Oblast during 12 months of 2011. Fourteen out of 16 rayons of the Oblast, as well as the administrative center were affected excluding only Gus-Khrustalny and Selivanovsky Rayons.

Number of rabies cases in rayons of the Vladimir Oblast in 2005-2011

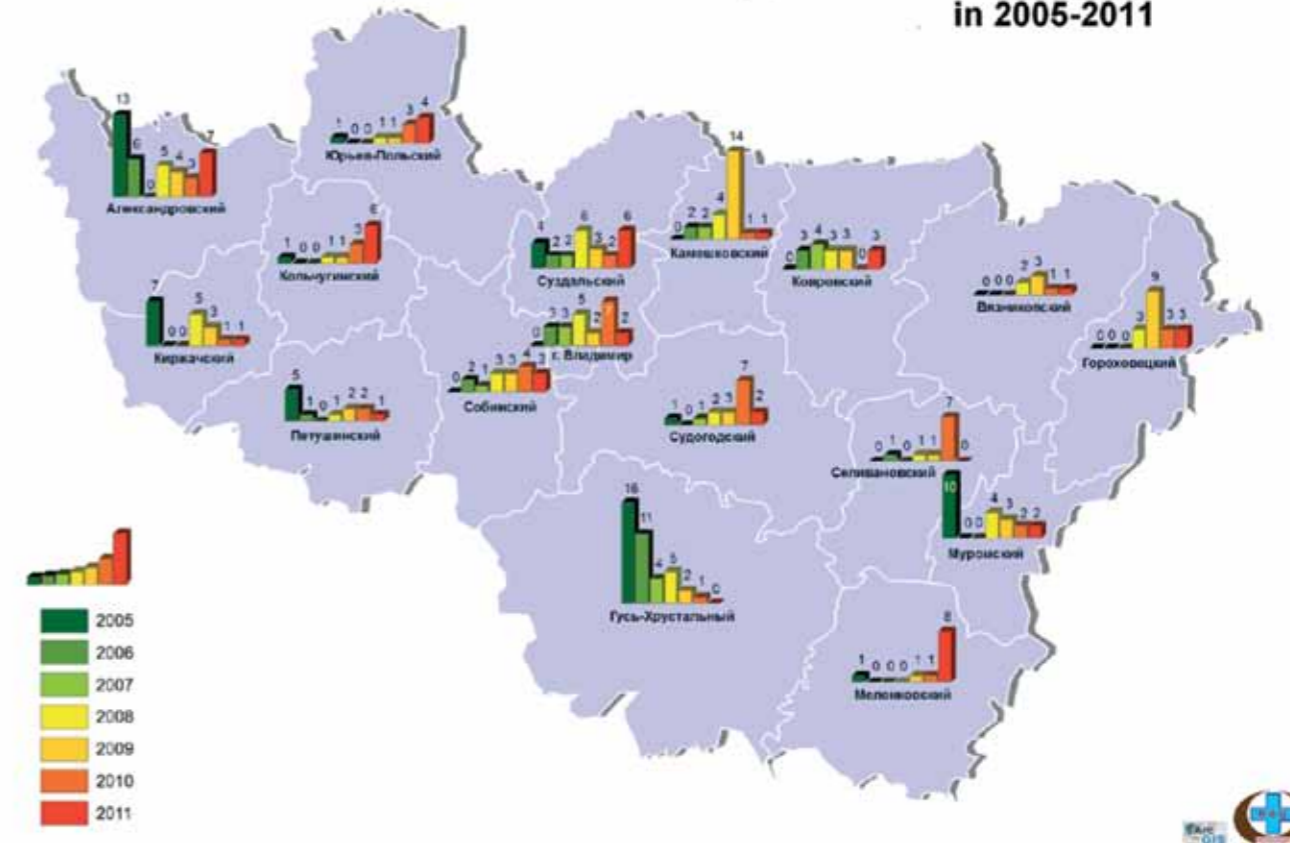


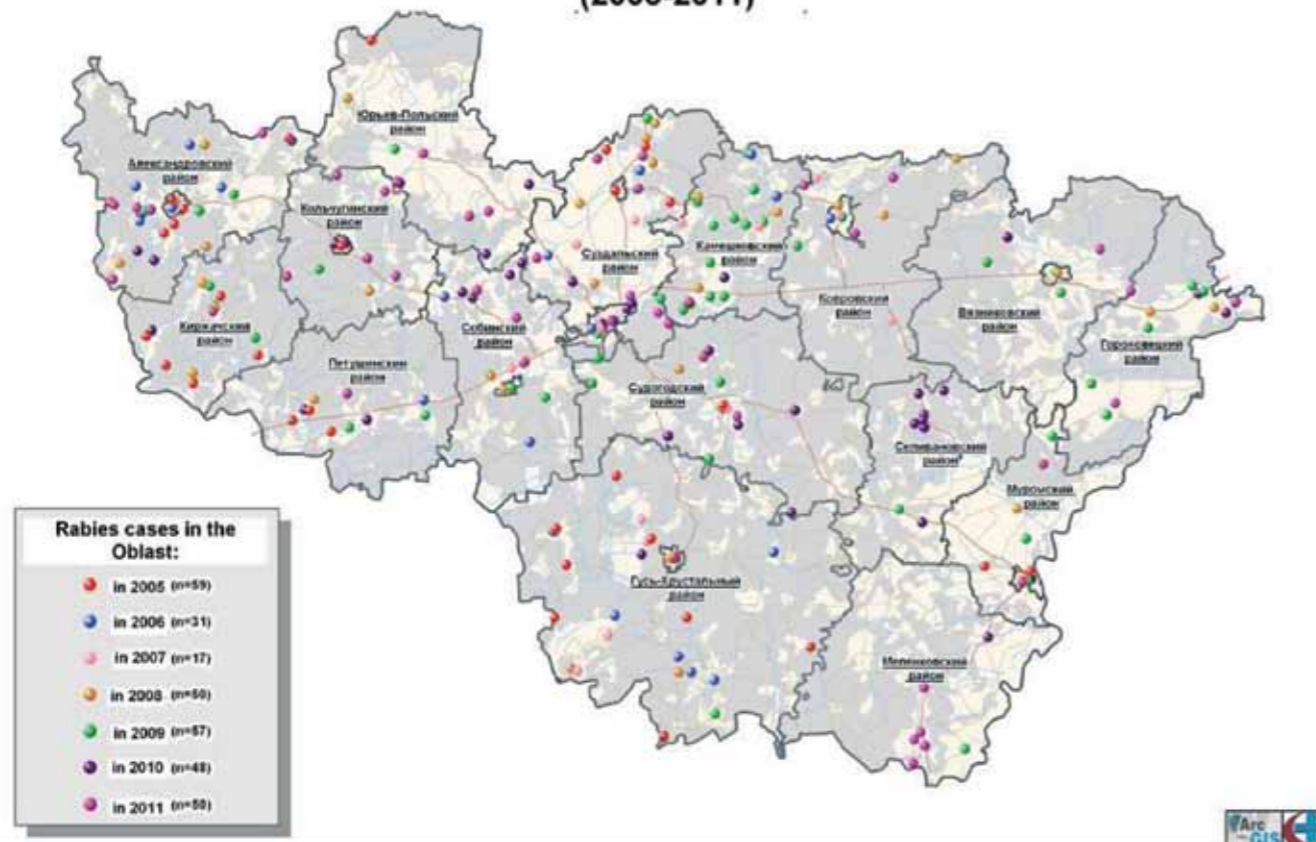
Fig. 1. Rabies affected territories of the Vladimir Oblast in the period from 2005 to 2011

Table 1. Fox population in the territory of different rayons of the Oblast varied in 2011

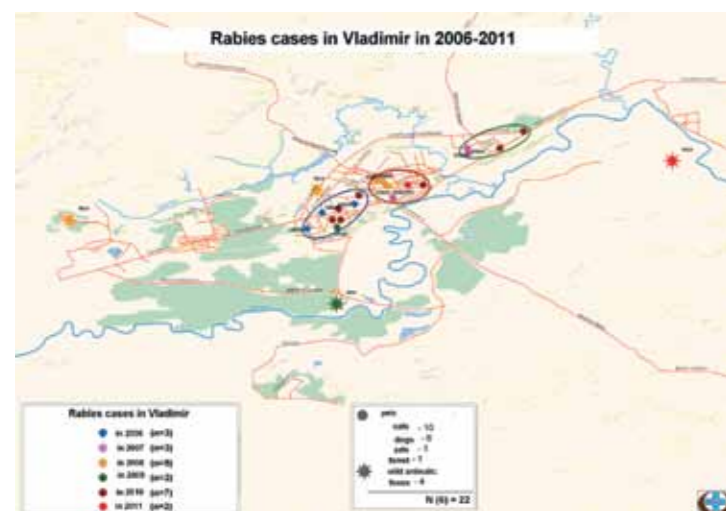
Rayon	Area (km <sup>2</sup> )	Population size (animals) in 2011	Population density (animal/1)	% of foxes to be killed	Number of foxes to be killed	Population density after killing
Alexandrovsky	1520,9	702	0,46	0,6	324	0,24
Vyaznikovsky	1897,5	322	0,16	–	–	–
Gorokhvetsky	960,7	147	0,15	–	–	–
Gus-Khrustalny	3019,7	442	0,14	–	–	–
Kameshkovsky	973,2	187	0,19	–	–	–
Kirzhachsky	987,8	206	0,2	–	–	–
Kovrovsky	1532,8	515	0,33	0,2	173	0,22
Kolchuginsky	1005,9	208	0,2	–	–	–
Melenkovsky	1773,7	424	0,23	–	–	–
Muromsky	996,4	205	0,2	–	–	–
Petushinsky	1390,6	263	0,18	–	–	–
Selivanovsky	1052,6	217	0,2	–	–	–
Sobinsky	1625,9	226	0,13	–	–	–
Sudogodsky	1783,7	210	0,11	–	–	–
Suzdalsky	1529,2	150	0,09	–	–	–
Yuryev-Polsky	1818,8	560	0,3	0,07	172	0,21
Total	23869,4	4984	0,2	–	669	0,18

fox population over the threshold value (0.2 animal/km<sup>2</sup>);  
fox population at the threshold value (0.2 animal/km<sup>2</sup>).

**Rabies outbreaks in the territory of the Vladimir Oblast (2005-2011)**



*Fig. 2. Geographical distribution of rabies cases in the Vladimir Oblast (2005-2011)*



*Fig. 3. Geographical distribution of rabies cases in Vladimir and in its vicinity (2006-2011)*

The majority of affected settlements were registered in the Alexandrovsky (6), Kolchuginsky (6), Suzdalsky (6) and Melenkovsky (5) Rayons. Alexandrovsky (7) and Melenkovsky (8) Rayons ranked first and second with respect to the number of reported cases in 2011. The situation significantly deteriorated in the latter after it had been relatively free for the last 6 years. By contrast, the number of cases in the Gus-Khrustalny Rayon is

decreasing each year with 16 cases reported in 2005 and no cases in 2011.

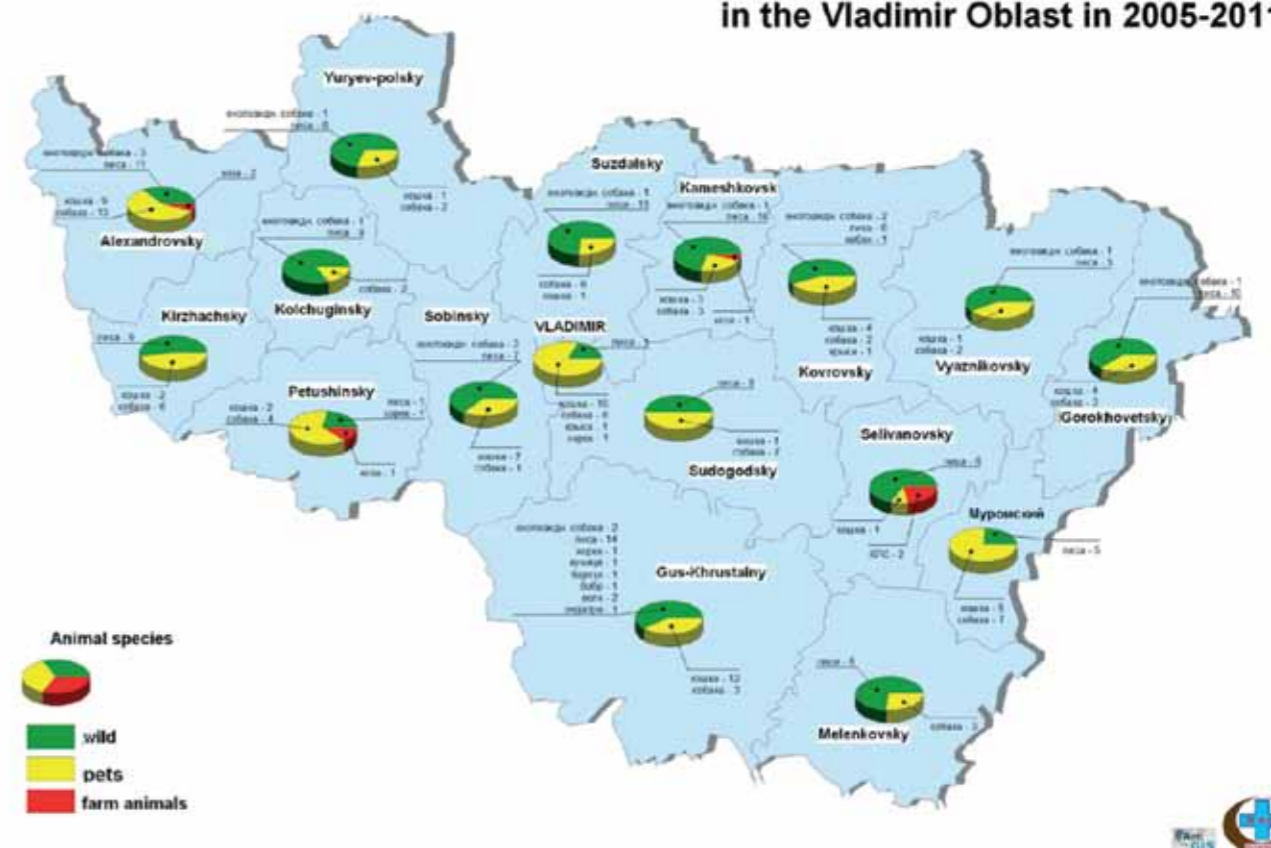
Besides, the situation is continuously deteriorating in the south-western and eastern parts of the Oblast, in particular, in the Alexandrovsky, Yuryev-Polsky and Gorokhovetsky Rayons, that is in the Rayons bordering on the Moscow, Yaroslavl and Nizhny Novgorod Oblasts which also remain severely affected by the disease. In 2011 the Moscow, Yaroslavl and Nizhny Novgorod Oblasts reported 236, 61 and 32 rabies affected settlements, respectively.

All rabies cases reported in the rayons of the Oblast for the period from 2005 to 2011 were located closely to the place of their registration according to the appropriate coordinate database (Figure 2).

The data presented in Figure 3 show that the situation in the administrative centre of the Oblast is ambiguous. In the period from 2006 to 2011 the disease was reported annually in the city (2-7 cases per year) with only 4 cases out of 22 being associated with wild animals (foxes) (18%). Moreover, only one case (2008) was registered within the city boundaries and the rest of them (3) were reported over 3 km from Vladimir.

The disease cases tend to cluster within the city boundaries with one cluster formed in the south-western part of the city (8 rabies cases – 36%), the second – in the eastern part (4 rabies cases – 18%) and the third – in the central part of the city (6 cases – 27%). The former two disease clusters are located predominantly in those districts of the city where single family houses with backyards are generally located as such locations are places of huddling and habitation of stray and feral dogs and cats. The third disease cluster is situated in the area where processing plants and garages are located and high density of stray cat and dogs is observed.

**Species-specific distribution of rabies cases in the Vladimir Oblast in 2005-2011**



*Fig. 4. Species-specific distribution of rabies cases in the Vladimir Oblast in the period from 2005 to 2011*

*Species-specific structure of rabies in the Vladimir Oblast*  
Analysis of the species-specific structure of rabies in the Vladimir Oblast (Fig. 4) demonstrates that vulpine rabies prevails among wild animals – 85% (142 cases) with raccoons and wolves account for 10% (16 cases) and 1% (2 cases) of the total number of cases, respectively.

It should be also noted that wild animals of Mustelidae family are involved in the maintenance of the natural

focus of rabies. In particular, rabies was diagnosed in a marten (1 case), a badger (1 case) and ferrets (2 cases).

Detection of rabies infection in a beaver and a muskrat using laboratory diagnostic methods is of special interest from the point of view of understanding of the role and place of these animals in the rabies epidemic process.

Analysis of the species composition of domestic carnivores of the Vladimir Oblast in which rabies was reported revealed that 74 cases (53%) were registered in dogs and 63 cases (46%) in cats. The ratio of cases in dogs and cats in the Administrative center of the Oblast was 27% to 45%, respectively (Fig. 4). These findings point to

**Table. 2. Number of diagnostic tests and positive rabies results for two animal populations in the Vladimir Oblast (2005-2011)**

Year	NUMBER OF TESTED SAMPLES								
	Total samples tested (number)			Including from domestic carnivores (number)			Including from wild animals (number)		
	total	positives	r*	total	positives	r*	total	positives	r*
2005	89	57		57	32		32	25	
2006	68	31		41	14		27	17	
2007	57	17		38	10		19	7	
2008	71	48	0,76	35	22	0,40	36	26	0,96
2009	116	56		68	22		48	34	
2010	94	46		52	19		42	27	
2011	110	50		64	17		46	33	

r\* – correlation coefficient

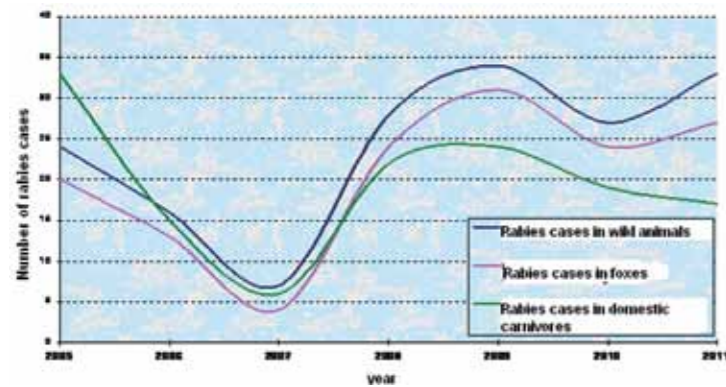


Fig. 5. Dynamics of rabies cases in wild life, pets and foxes (2005-2011)

the need for the regulation and immunization of the stray animal population.

Study of the dynamics of rabies outbreaks in wild and domestic carnivores in 2005-2011 (Fig. 5) enabled to identify that annual fluctuations of rabies cases in these groups of animals were to a certain extent interrelated (correlation coefficient = 0.61). Number of rabies cases in foxes is directly proportional to the total number of cases among wild animals ( $\kappa=0.99$ ) with the incidence in fox population being 85% for the given period. Marked correlation between the disease incidence in foxes and the size of their population inhabiting the territory of the Vladimir Oblast in 2008-2011 was detected ( $r=0.95$ ).

Due to the positive correlation of the incidence in foxes and other wild animals, as well as between the fox population size and the incidence, measures for the disease incidence decrease in the territory of the Oblast should include not only vaccination of wild animals but also the reduction of fox population as one of the methods of rabies control. It should be also taken into account that in order to stop the virus circulation it is necessary to reduce fox population down to the threshold value – not more than 0.2 animal/km<sup>2</sup> [2].

Table 1 presents the calculation of the percent of foxes to be killed in the territory of rayons of the Oblast in order to achieve the subthreshold level of the population density [2]. Fundamental equation was used for this (according to Anderson et al., 1981);

$$p > 1 - 1 / (K - KT)$$

where,  $p$  – percent of foxes to be killed;  
 $K$  – current population density;  
 $KT$  – threshold population density (0.2 animal/km<sup>2</sup>).

As it could be seen from Table 1, fox population in the territory of three rayons of the Oblast (Alexandrovsky, Kovrovsky and Yuryev-Polsky) should be reduced and particular attention should also be given to the Kirzhachsky, Kolchuginsky, Muromsky, Melenkovsky and Selivanovsky Rayons where fox population is at the threshold level as Table 1 presents fox population density estimates calculated using winter route tracking data. Increase of natural lethality and killing of foxes in winter results in the temporary reduction of their population. In autumn after young animals have become independent

the population density can be three times higher resulting in the proportional increase of the number of animals to be killed [2].

It should be also noted that along with the increased number of rabies cases the number of diagnostic tests for the disease is also getting up.

The data from Table 2 show that correlation coefficient for wild animals is rather high and amounts to 0.96 which is indirectly indicative of the incident nature of diagnostics (clinical suspects are tested using laboratory methods). For domestic carnivores this coefficient is rather low (0.54) and the general correlation coefficient for the Oblast as regards the number of tests and number of positive results amounts to 0.76 testifying to the endemic status of rabies.

Therefore, results of diagnostic tests do not reflect actual rabies situation within the population as, generally, knowingly affected (or likely diseased) animals are tested and it means that the actual prevalence of the disease is higher. In other words, diagnostics is predominantly incident.

### CONCLUSION

Currently the rabies situation in most rayons of the Vladimir Oblast remains complicated.

241 rabies-affected settlements were recorded in the Vladimir Oblast with the different degree of spread in different rayons from 2005 to 2011. Rabies cases were detected in 14 out of 16 rayons of the Subject (45 affected settlements) and the Administrative center of the Oblast (2 affected sites) with the majority of affected settlements detected in the Alexandrovsky, Kolchuginsky, Suzdalsky and Melenkovsky Rayons of the Oblast.

The majority of rabies cases in the Vladimir Oblast during 2005-2011 were reported in wild animals – 169 cases (54%), domestic carnivores ranked second with 135 cases (44%) and percent of cases in farm animals amounted to 2%. Vulpine rabies prevails in wildlife and as for pets the number of cases in dogs and cats is similar.

Measures for rabies incidence decrease in the territory of the Oblast should include not only vaccination of wild animals but also reduction of fox population as one of the methods of rabies control. Primarily, it concerns fox population in the territory of Alexandrovsky, Kovrovsky and Yuryev-Polsky Rayons.

Rabies diagnostics is often incident in particular in wild animals.

The results presented should be taken into account by the Veterinary Service of the Oblast while developing measures for veterinary surveillance, monitoring, control and survey of rabies epidemic situation.

### REFERENCES

1. Rabies in the Vladimir Oblast: geographical epidemiology with mapping: Inf Anal Bulletin / A.V. Belchikhina, M.V. Dudorova, M.A. Shibayev, S.A. Dudnikov. – Vladimir: FGBI «ARRIAH», 2011. – 46 p.
2. Rabies in the southern part of Western Siberia in 1990-2000: issues and search for solution / I.V. Kuzmin, G.N. Sidorov, A.D. Botvinkin [et al.] // Veterinarnaya Patologiya. – 2001. – No. 1. – P. 92–100.
3. Rabies incidence in the Russian Federation – URL: [http://www.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic\\_situation/15934/](http://www.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/15934/) (дата обращения: 04.04.2012).
4. Epidemiological situation in the Russian Federation in 2011 – URL: [http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2011/files/iac2011\\_12mes.pdf](http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2011/files/iac2011_12mes.pdf) (date of request: 04.04.2012).

## ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

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

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

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

#### ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



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



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

#### ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10-12-ти страниц – но не менее 5-ти (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы). В случае, если у вас нет возможности перевести статью самостоятельно, редакция в индивидуальном порядке готова помочь решить эту проблему.

\*Предоставление в редакцию рукописи статей являются подтверждением согласия автора на использование его произведения, как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник.

#### СТРУКТУРА 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

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

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

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

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

#### УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

С 1 сентября 2012 года открыта подписка на журнал «Ветеринария сегодня» в каталоге «Газеты. Журналы» ОАО Агентство «Роспечать» на первое полугодие 2013 года. Подписной индекс издания 70460, стоимость подписки на полугодие (два номера журнала) 1520 руб. 00 коп. Подписаться на журнал можно в любом отделении «Почты России».

#### БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ О ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec  
 телефон: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88  
 Контактное лицо: Борисова Ольга Анатольевна (тел. добавочный 22-27)  
 Иголкин Алексей Сергеевич (тел. добавочный 20-20)

# ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»



(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

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

- Референтная лаборатория по бешенству в РФ
- Референтная лаборатория по гриппу и ньюкаслской болезни птиц в РФ
- Испытательный центр



Международные статусы ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

- Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья
- Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру

Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,  
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)  
Тел./факс: (4922) 26-38-77, 26-15-25. Тел.: (4922) 26-06-14, 26-15-12  
e-mail: [mail@arriah.ru](mailto:mail@arriah.ru); <http://www.arriah.ru>