

ISSN 2304-196X

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

ВНИИЗЖ

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

ОКТАБРЬ №4 {7} 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
- 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 №4(7) 2013 научный журнал

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

Шеф-редактор: Анна Глаголева

Выпускающие редакторы: Ольга Борисова, Юлия Трофимова, Ольга Лесных, Юлиана Бададгулова
e-mail: veterinarytoday@yandex.ru, **тел.:** +7915 477 78 36

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

– **Ю.А. Пивоварчик** – первый заместитель директора Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия – Главный государственный ветеринарный инспектор Республики Беларусь

– **Г.С. Исаева** – д.ф.н., к.с.-х.н., Вице-Министр Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан

– **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: Лариса Грибининова

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»
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 18 октября 2013 года

СОДЕРЖАНИЕ CONTENTS

- 5** Поздравление Руководителя Россельхознадзора С.А. Данкверта ФГБУ «ВНИИЗЖ» с юбилеем
- 6** В.В. Макаров, В.А. Грубый
Африканская чума свиней: эпизоотический полиморфизм и контроль. Часть III. Экономика и экстраполяция на РФ
- 10** А.А. Муминов, М.А. Аноятбеков
Особенности клинического проявления сибирской язвы и биологические свойства возбудителя заболевания
- 16** А.П. Гериллович, Б.Т. Стегний, И.В. Горайчук, А.С. Солодянкин, В.И. Болотин
Разработка рекомбинантного положительного контроля вируса диареи крупного рогатого скота I и II типа с помощью ПЦР
- 22** Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев, К.Х. Папуниди, Т.Р. Гайнутдинов, Н.А. Мухамметшин, Р.Д. Хузин
Пути оздоровления хозяйств от болезней пальцев, копытцев и некробактериоза
- 28** В.Б. Тен, С.Г. Канатбаев, Е.К. Туяшев, Б.М. Мустафин, Ж.К. Тоганаев
Генеративный подход к научно обоснованной схеме при профилактике бруцеллеза крупного рогатого скота
- 34** А.С. Бандельюк, Е.С. Седова, И.Ю. Грибова, И.Б. Есмагамбетов, Б.В. Новиков
Экспрессия гена гемагглютинаина вируса гриппа А в инфицированных клетках мышинной миеломы SP2/0-AG.14
- 40** С.А. Гужвинская
Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобактерий для разработки биопрепаратов
- 45** С.Г. Канатбаев, В.Б. Тен, Е.К. Туяшев, Е.С. Нысанов
Использование иммуномодуляторов при бруцеллезе животных
- 49** Е.В. Чернышова, Н.А. Назаров, А.Е. Метлин
Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и анализ эффективности антирабической вакцинации среди домашних животных, вывозимых за границу
- 6** V.V. Makarov, V.A. Grubby
African swine fever: epidemic polymorphism and control. Part III. Economics and extrapolation the RF
- 13** A.A. Muminov, M.A. Anoyatbekov
Anthrax specific clinical signs and the disease agent biological properties
- 19** A.P. Gerilovich, B.T. Stegny, I.V. Goraichuk, A.S. Solodyankin, V.I. Bolotin
Development of recombinant positive control of type I and II bovine viral diarrhea virus by PCR
- 25** D.A. Khuzin, Kh.N. Makayev, K.Kh. Papunidi, T.R. Gainutdinov, N.A. Mukhammetshin, R.D. Khuzin
Ways to eradicate bovine hoof diseases and interdigital necrobacteriosis on farms
- 31** V.B. Ten, S.G. Kanatbayev, E.K. Tuyashev, B.M. Mustafin, Zh.K. Toganayev
Generative approach to scientifically grounded regimen for bovine brucellosis prevention
- 37** A.S. Bandelyuk, E.S. Sedova, I.Yu. Gribova, I.B. Yesmagambetov, B.V. Novikov
Influenza a virus hemagglutinin expression in infected murine myeloma cell line SP2/0-AG.14
- 42** S.A. Guzhvinskaya
Perspective bifidobacterium and lactic acid bacterium strain search for biological development
- 45** S.G. Kanatbayev, V.B. Ten, Ye.K. Tuyashev, Ye.S. Nysanov
Use for immunomodifiers for control of animal brucellosis
- 49** E.V. Chernyshova, N.A. Nazarov, A.E. Metlin
Epizootic situation on rabies in Russia and the analysis of the effectiveness of anti-rabies vaccination of domestic animals which are exported abroad

ДОРОГИЕ КОЛЛЕГИ!

Позвольте поздравить вас со знаменательным юбилеем – 55-летием образования Федерального центра охраны здоровья животных.

Созданный более полувека назад для решения только одной проблемы ящура, институт прошел долгий и сложный путь становления.

В 1958 году институт был организован для сосредоточения усилий ученых и практической ветеринарной службы на ликвидацию этого опасного заболевания, и коллектив успешно справился с поставленной задачей.

Были изучены теоретические и прикладные вопросы биологии вируса ящура, разработаны надежные методы и средства диагностики и профилактики, а также обоснованы эффективные меры борьбы с ящуром применительно к различным регионам, что позволило стабилизировать эпизоотическую ситуацию в стране.

Учитывая высокий научно-практический потенциал института и достигнутые успехи в борьбе с ящуром, в 1995 году он был наделен функциями Региональной справочной лаборатории Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) по ящуре, в 1997 году – Центра МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья, что свидетельствует о международном признании проводимых в институте работ.

С 1992 г. начинается новый этап в развитии института, что проявилось в изменении его названия, он был переименован во Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных (ВНИИЗЖ), и в расширении проблем борьбы с другими болезнями крупного и мелкого рогатого скота, свиней и птиц, а также в организации промышленного производства иммунобиологических, химических и других препаратов.

В настоящее время ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), являясь Референтным центром по научному и методическому обеспечению деятельности Россельхознадзора, его территориальных управлений и подведомственных ему организаций, осуществляет научное сопровождение всех работ, связанных с мониторингом вирусных инфекционных болезней, оценкой рисков их заноса, а также распространением, предупреждением и ликвидацией возможных очагов болезней животных, осуществлением мероприятий по охране здоровья животных и защите окружающей среды.

В ФГБУ «ВНИИЗЖ» впервые разработана и успешно используется на практике комплексная система слежения за эпизоотической ситуацией, включающая диагностику, данные изменения генетической структуры возбудителей с использованием современных методов молекулярной биологии, серологического мониторинга. Созданная система позволяет существенно снизить напряженность эпизоотической ситуации в стране, а использование вакцин на основе штаммов, имеющих максимальное соответствие циркулирующим на территории РФ эпизоотическим изолятам, способствует уменьшению экономического ущерба от инфекционных болезней животных.

В 2013 году, подтвердив его высокую репутацию в сфере науки, технологий и политики, Продоволь-



ственная и Сельскохозяйственная Организация Объединенных Наций присвоила ФГБУ «ВНИИЗЖ» статус «Референтный центр ФАО по ящуре для стран Центральной Азии и Западной Евразии». Это еще одно международное признание – доказательство значимости Центра для мировой ветеринарии.

Современный мир диктует новые правила, новые направления развития. И ФГБУ «ВНИИЗЖ» старается быть не только лидером на рынке ветеринарных препаратов и услуг, но и развивает новые направления.

В институте функционирует аккредитованный Испытательный центр, который ежегодно проводит исследования более 80 тыс. образцов пищевой и животноводческой продукции, кормов, кормовых добавок, биологических препаратов, объектов окружающей среды. Здесь впервые в России отработана методика идентификации географической принадлежности пищевой продукции и сырья.

Молодые специалисты Центра разрабатывают и поддерживают функционирование специализированных электронных систем, предназначенных для автоматизации процесса сбора, передачи и анализа информации в различных сферах деятельности Россельхознадзора: Аргус, Веста, Ассоль, Меркурий и др.

Сегодня коллектив ФГБУ «ВНИИЗЖ» не только сохранил свой накопленный научный потенциал, но и продолжает готовить высококвалифицированных специалистов для ветеринарной отрасли страны.

Пусть вам всегда сопутствует удача и успех в научной деятельности на благо России!

Руководитель Россельхознадзора
С.А. Данкверт

АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ: ЭПИЗООТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И КОНТРОЛЬ ЧАСТЬ III. ЭКОНОМИКА И ЭКСТРАПОЛЯЦИЯ НА РФ

В.В. Макаров¹, В.А. Грубый²

¹ доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, г. Москва, e-mail: vvm-39@mail.ru

² доктор экономических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Изложены экономические аспекты программ и результатов эрадикации африканской чумы свиней в различных условиях. В этом контексте обсуждается обстановка в Российской Федерации.

Ключевые слова: африканская чума свиней, эпизоотии, энзоотии, эрадикация, Российская Федерация.

UDC 619:578.842.1:616-036.22

AFRICAN SWINE FEVER: EPIDEMIC POLYMORPHISM AND CONTROL PART III. ECONOMICS AND EXTRAPOLATION TO THE RF

V.V. Makarov¹, V.A. Grubyy²

¹ Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, e-mail: vvm-39@mail.ru

² Doctor of Science (Economics), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

Economic aspects of programs for African swine fever eradication under different conditions and their results are demonstrated. Against this background current situation in the Russian Federation is discussed.

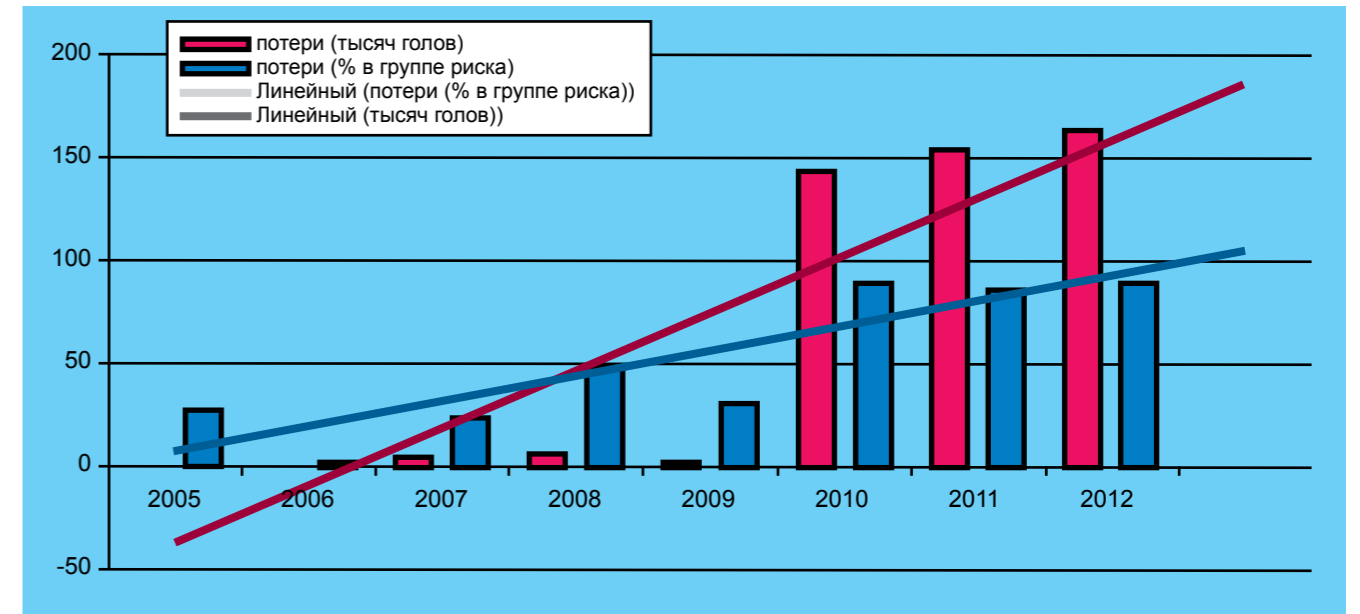
Key words: African swine fever, epizootics, enzootics, eradication, Russian Federation.

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Некоторые известные данные характеризуют экономические аспекты ущерба, наносимого эпизоотиями африканской чумы свиней (АЧС), и последствий их ликвидации. Так, поистине катастрофические потери и общественно-экономические проблемы сопровождали становление нового центрально-западноафриканского нозоареала: во время вспышек и эпизоотий АЧС в западном Камеруне в 1982 г. неблагополучие охватило 1,1 млн домашних свиней (63 % сви-

нопоголовья страны) с неподдающейся учету гибелью и расстройством отраслей хозяйства, вовлеченных в переработку и производство свинины, в Кот-д'Ивуаре в 1996 г. пали 54,5 тыс. свиней – 29 % всей популяции и 80 % коммерческого сектора [3]. Для современной ситуации по АЧС в Африке в этом отношении характерен «прогрессирующий» рост прямых потерь (рисунок).

Стоимость свиноголовья на о. Гаити (в 1978 г.), полностью ликвидированного впоследствии, составляла 70–90 млн долларов, фаза репопуляции оценивалась в 8,5 млн долларов. Особо тяжелые, многофакторные последствия имела эпизоотия АЧС в Бразилии (1978–1985). Сложившаяся ситуация может служить примером беспрецедентного социально-экономического влияния эпизоотии АЧС на существование крупного государства в случае заноса и распространения этой инфекции. Правительство страны ранее предпринимало специальные меры по расширению свиноводства как отрасли производства пищевого белка, дающей большие экономические выгоды перед другими в себестоимости и быстром снабжении населения, а также имеющей социальные преимущества вслед-



ствии обеспечения высокорентабельной занятости значительного количества мелких собственников в сельскохозяйственных районах. Эпизоотия АЧС сопровождалась сокращением на 40 % потребления свинины на внутреннем рынке и прекращением ее экспорта, эмбарго некоторыми странами на другие традиционные бразильские продукты животноводства и даже растениеводства, в частности, кофе, соевые бобы и бананы. Чрезмерное поступление свиней на перерабатывающие предприятия для вынужденного убоя, вследствие этого значительное превышение поставок свинины на внутренний рынок над сократившимся спросом на нее и резкое падение цен привели к ухудшению материального состояния предпринимателей и населения страны, занятых в области свиноводства, увеличению уровня безработицы, банкротству мелких фермеров и т.п. Прямые и косвенные затраты при чрезвычайных обстоятельствах на мероприятия, связанные с ликвидацией свиней на первом этапе (1978–1979), в целом составили 14,6 млрд долларов и значительно превышали выгоды (соотношение 3,25:1). Лишь во второй фазе искоренения болезни, основанной на серологическом обследовании (1980–1985), баланс приобрел положительное значение (1:1,62) [1, 2, 5].

Ежегодные потери в период энзоотии в Испании превышали 15 млн долларов (1983), в фазе эради-

Рис. Экономический ущерб от АЧС в Африке в 2005–2012 гг. – абсолютные, относительные потери (тысяч голов и % в группах риска) и линейные тренды

кации (1985–1995) ежегодные затраты составляли 100 млн долларов. Инвестиции ЕС в осуществление Программ эрадикации на финальной стадии составили >53 млн долларов (половина их общей стоимости). Если в 1960 г. в стране насчитывалось 6 млн свиней, производилось 260 тыс. тонн свинины, по 8 кг на жителя, то в начале кампании, в 1986 г. эти показатели составляли 13,5 млн голов, 1 160 тыс. тонн и 33 кг, в 1989 (реализация первой Программы) – 17 млн голов, 1 200 тонн и 38 кг (фактор роста от 3 до 6 по сравнению с 1960 г.), в 2010 г. – 25 млн голов (страна вышла по этому показателю на второе место в ЕС после Германии), 2 270 тыс. тонн и 65 кг, соответственно. В свиноводческом секторе экономики заняты более 200 000 человек (0,6 % населения страны) [4, 5].

В ситуации Куба-80 стоимость ликвидированных животных составила 1 млн долларов, компенсация потерь владельцам – 4,2 млн долларов, затраты на осуществление мероприятий – 3 млн долларов, рыночные и экспортные издержки – 1,8 млн долларов. Общая сумма ущерба достигла 10 млн долларов. Были

Таблица 1. Суммарные показатели ущерба, причиненного эпизоотиями АЧС в наиболее неблагополучных регионах мира во второй половине 20 в. и в текущей эпизоотии в РФ [5]

Страны, регионы	Годы	Пало и ликвидировано свиней (тысяч)	Ущерб (долларов)
Республика Куба	1971	465	?
Республика Куба	1980	140	10 млн
о. Гаити	1978–1983	1200–1900	70-90 млн
Бразилия	1978–1985	67	14.6 млрд
Испания	1985–1995	?	950 млн
СССР	1977	410	?
Российская Федерация	2007–2012	600 (400 вспышек)	1 млрд

Таблица 2. Типичные показатели количественной эпизоотологии АЧС в РФ (наиболее неблагополучные регионы юга страны, январь-август 2010 г.) в формате WAHID [1]

Неблагополучные регионы	АЧС среди домашних свиней									
	Количественные данные (поголовье)						Индексы (%)			
	Экспозировано*	Заболело	Потери			Заболваемости	Смертности**	Летальности	Потерь***	
Пало			Уничтожено	Убито	Всего					
Ростовская обл.	28500	450	320	4300	4400	9020	1,6	1,1	71	32
Краснодарский край	5300	94	83	4400	300	4783	1,8	1,6	88	90
Волгоградская область	1200	36	36	790	–	826	3	3	100	69
Всего в РФ	37500	1000	450	9650	4700	14800	2,7	1,2	45	40

Обращает на себя внимание факт далеко не полной ликвидации экспозированных свиней в эпизоотических очагах (в овале).

* популяция риска;

** отношение числа павших к численности популяции риска, свидетельство экстренности принимаемых мер;

*** отношение общего числа павших, уничтоженных и убитых к экспозированным, свидетельство полноты реализации политики стемпинг аут.

привлечены к участию 42 312 человек, трудозатраты составили 2 млн рабочих часов. 936 единиц транспорта проработали более 130 тыс. часов [5].

Согласно расчетам, в США каждый эпизоотический инцидент, обусловленный АЧС, приведет к потерям 4,5 млрд долларов за счет мероприятий по эрадикации и эмбарго продукции (~10 % бюджета всего животноводства страны) [5].

ВОЗМОЖНЫЕ СЦЕНАРИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

С учетом изложенного, исходя из пятилетней истории возникновения и распространения АЧС в РФ и вероятного становления энзоотичности в Северокавказском регионе и Тверской области, целесообразно сформулировать гипотетические пути развития ситуации и варианты решения проблемы АЧС в стране.

Эффективное искоренение болезни в первичных очагах и недопущение ее дальнейшего распространения могли бы быть достигнуты только с помощью активного эпизоотологического надзора и политики депопуляции в течение первого хронологического кластера эпизоотии (ноябрь 2007 – ноябрь 2008 гг.) в масштабах неблагополучных и угрожаемых южных субъектов федерации (согласно опыту обеих эпизоотий в Республике Куба). Не противозипоотический по своей сути стемпинг аут, т.е. подворное уничтожение свиней в возникающих эпизоотических очагах, приемлемый только на неэнзоотичных территориях при первичных, единичных или малочисленных локальных вспышках, а тотальная ликвидация всего поголовья домашних и диких свиней с профилактическими целями была бы единственно эффективной в этом случае. В настоящее время на юге РФ, с учетом известных обстоятельств административного, социального порядка, ментальности населения, этот сценарий практически нереален.

Паллиативы, мониторинг вместо надзора, полумеры, компромиссы и т.п. борьба со следствием, а не причиной, как известно, наименее результативны. По данным регистрируемой эпизоотологической статистики из радикального контроля выпадает более половины неблагополучного поголовья – многие тысячи свиней и масса продукции (табл. 2). Именно таким образом энзоотия в домашнем свиноводстве и природная очаговость могут растянуться на десятки лет, как в Иберийском регионе или на о. Сардиния, что чревато аналогичным ущербом.

Наиболее рационально в имеющихся, особенно на юге РФ, социальных, национальных и т.п. условиях предоставить эпизоотической ситуации «свободное плавание» в существующих территориальных пределах стационарного неблагополучия в качестве индигенной энзоотии без особых вмешательств, так, как это делается в экзотических африканских нозоареалах. В течение 3–5 лет, рано или поздно, обстановка сама собой разрешится, неблагополучие самоликвидируется на «мелкотоварном», самодеятельном уровне. АЧС искоренят сами частники-свиноводы и население, когда реальная жизнь банальным способом, через семейный бюджет убедит их в экономической и социально-хозяйственной неизбежности соблюдения требований биозащиты.

Нельзя исключать также, что властными структурами на региональном уровне ситуация будет наконец всерьез воспринята как социальная биокатастрофа и осуществлена радикальная борьба с АЧС в качестве важной государственной проблемы продовольственной безопасности (вплоть до реализации третьего сценария и «золотого стандарта», см. часть I) [1]. Следует учитывать, что, как показал глобальный опыт, в успехе эрадикации решающими элементами повсеместно были максимальное использование неветеринарных, т.е. государственных и административных ресурсов, создание специальных бюджетных, общественных, частных, инвестиционных фондов, безупречная организация, сознательное участие владельцев, населения, добровольцев, различных ассоциаций, армии, полиции, международное сотрудничество по науке, консалтингу, инвестициям, активная роль средств массовой информации.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом триумфальные результаты противозипоотической деятельности по эрадикации как эмерджентных эпизоотий АЧС, так и, особенно, энзоотий служат впечатляющим примером экономической, социальной и даже политической значимости ветеринарии и защиты животных как отрасли науки и сферы практической деятельности в глобальном масштабе. Это лучшее подтверждение декларации МЭБ, принятой на Конференции в Женеве в 2005 г., согласно которой «государственные ветеринарные службы официально признаны как международное благо человечества». Вместе с тем требуют особого внимания некоторые



Рис. Группа награжденных участников ликвидации эпизоотии африканской чумы свиней на Украине. Москва, Кремль, 1978 год.

выводы и обобщения, вытекающие из изложенного выше и опубликованных материалов о современной эпизоотической обстановке по АЧС в Российской Федерации, имеющие научную и практическую актуальность и перспективы в новейшей естественной истории заразных болезней.

1. Применительно к эпизоотологии АЧС важнейшими предпосылками для концептуального и практического решения частных проблем являются:

- перманентная гетерогенность природных вирусных популяций по вирулентности – важнейшему признаку, определяющему саморегуляцию эпизоотического процесса как паразитарной системы;
- диверсификация вирусных популяций в течение естественных процессов возникновения и глобального распространения АЧС;
- критическая роль летальности в природных циклах инфекции и убоя в антропоургических циклах в качестве факторов естественного или непреднамеренного искусственного отбора энзоотических, низко-вирулентных разновидностей вируса АЧС.

2. Некоторые эмерджентные проблемы, возникшие в связи с АЧС в РФ:

- квазидиагностика – не просто неправильный, ложный или отложенный диагноз, а вся «совокупность» отягченных последствий принятия (или неприятия) профессиональных, административных и т.п. решений в отношении другой, как правило, менее опасной патологии. Примерами служат признание вместо АЧС массового отравления свиней, затем КЧС (Украина, 1977), синдрома постыломного мультицистического истощения (Грузия), КЧС (Республика Маврикий), пастереллеза (Российская Федерация), вместо высокопатогенной формы РРСС – новой «высоко лихорадочной болезни свиней» (Китай);
- микст-энзоотии или проэпизоотичивание с замаскированным «участием» АЧС или других трансграничных инфекций, возникновение и распространение которых не лишены реальных оснований (на примере Бразилии). Последнее ставит вопрос о серьезном пересмотре требований к диагностике – обязательности

тотального тестирования на АЧС и другие опасные инфекции во всех сомнительных и недиагностируемых случаях, при интенсивном серомониторинге, ретроспективной диагностике максимальной хронологической глубины, при необходимости – анализе и ревизии серум-банков.

3. Положения наиболее общего порядка:

- очевидность на данном этапе радикальных изменений тривиальных эпизоотических процессов, определяющих формирование заболеваемости;
- преобладающая роль факторов социально-хозяйственного порядка и синергизирующая деятельность человека в качестве причин возникновения, распространения, эмерджентности, энзоотичности болезней;
- «человеческий фактор» как основная движущая сила эпизоотических процессов (что особенно наглядно в ситуации с АЧС в Грузии и южном регионе Российской Федерации);
- необходимость радикального пересмотра догматов эпизоотологии и исключения из оборота схоластики «эпизоотических цепей» и «механизмов передачи инфекции».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макаров В.В. Африканская чума свиней. – М.: РУДН, 2011. – 268 с.
2. Lyra T. The eradication of African swine fever in Brazil, 1978–1984 // Rev. Sci. Tech. – 2006. – Vol. 25. – P. 93–103.
3. Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa / A.L. Baratang. – Univ. Pretoria. – 2005. – 132 p.
4. Scientific review on African Swine Fever / J. Sánchez-Vizcaino [et al.] // CFP/EFSA/AHAW/2007/2. – 2009. – 141 p.
5. Trends in emerging viral infections of swine / ed. A. Morilla [et al.]. – Iowa State University Press, Ames, 2002. – 380 p.

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.А. Муминов¹, М.А. Аноятбеков²

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, НПП «Биологические препараты», ТАСХН, г. Душанбе, e-mail: amuminov@list.ru

² доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, НПП «Биологические препараты», ТАСХН, г. Душанбе

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты изучения влияния антропогенных факторов на клинические проявления заболевания и биологические свойства возбудителя сибирской язвы в условиях жаркого климата. Атипичное течение сибирской язвы обуславливает длительное выделение возбудителя в окружающую среду и способствует его рассеиванию и рециркуляции в природе. Установлено, что все выделенные изоляты *Bacillus anthracis* обладали высокой степенью патогенности, при этом максимальная – отмечена у изолятов, выделенных от крупного рогатого скота, овец и коз.

Ключевые слова: сибирская язва, антракс, клинические признаки, животные, антропогенные факторы, биологические свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель сибирской язвы, попав с кровью, мочой или калом на почву, траву, корма и воду, образует споры. Животные заражаются и заболевают, проглатывая с кормом, водой, почвой споры сибирской язвы, а также через укусы слепней, мух-жигалок, комаров, мошек, имевших контакт с большими животными или контаминированной средой. По течению болезни различают 3 формы сибирской язвы: молниеносную, острую, подострую. Имеются также сообщения о хроническом и атипичном течении заболевания у сельскохозяйственных и диких животных [4, 5, 6].

Сибирская язва во многих странах мира продолжает представлять серьезную проблему для здравоохранения и сельского хозяйства [2, 4, 5]. На территории Республики Таджикистан спорадические случаи заболевания животных и людей сибирской язвой отмечаются постоянно [1, 3]. Наряду с типичными представителями вида *Bac. anthracis* существование множества атипичных форм, отличающихся по фенотипическим и генетическим признакам, является свидетельством высокой пластичности генома возбудителя сибирской язвы и его значительных потенциальных возможностей, позволяющих быстро перестраиваться под воздействием биотических и абиотических факторов, приводящих к изменению тех или иных свойств микроба. По данным некоторых исследователей [6, 7], частота выделения атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы приблизительно равна частоте выделения штаммов, ошибочно идентифицированных как *Bac. anthracis*. Это объясняется общностью свойств *Bac. anthracis* с близкородственными микроорганизмами рода *Bacillus*, что значительно затрудняет их иден-

тификацию. В конце 90-х и начале 2000-х гг. в Таджикистане в связи с широким применением антибиотиков широкого спектра и пролонгированного действия, дезинфектантов и средств серо- и химиотерапии в животноводстве, а также применением различных препаратов для борьбы с саранчой в предгорных и долинных зонах Таджикистана изменилась биология возбудителя заболевания и клиническое течение сибирской язвы. Поэтому в последние годы у большинства сельскохозяйственных животных заболевание протекало без выраженных клинических признаков, что затрудняло прижизненную диагностику сибирской язвы. Все это обуславливает необходимость дальнейшего изучения биологических и генетических особенностей возбудителя сибирской язвы.

Целью исследований было изучение факторов, влияющих на особенности клинических проявлений сибирской язвы у животных, а также на биологию вирулентных и авирулентных изолятов возбудителя сибирской язвы, выделенных в условиях Таджикистана, и выявление внутривидовых различий с использованием традиционных и дополнительных методов исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были сельскохозяйственные животные разных видов и возрастных групп, а также изоляты *Bac. anthracis*, выделенные от животных, козсырья и из почвы. Анализ клинического проявления сибирской язвы у животных изучали на основании наблюдений практических ветеринарных специалистов и результатов собственных исследований общепринятыми методами. Исследования по выявлению биологических свойств проводились согласно требованиям МУК 01.09.86 г. «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды» и МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы», в которых одним из опорных тестов, позволяющих идентифицировать штаммы *Bac. anthracis*, является их лизабельность бактериофагом.

Для идентификации изолятов был использован бактериофаг диагностический сибиреязвенный жидкий Fah ВНИИВВиМ производства ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (г. Покров). Препарат сибиреязвенный бактериофаг Fah ВНИИВВиМ содержал $1,2 \times 10^9$ фаговых частиц/мл и имел рН 7,1. Изучение специфической активности и специфичности препарата проводили путем посева исследуемых изолятов на чашки Петри с агаром Хоттингера рН 7,2±0,1. Выросшую культуру через 24 ч инкубации при температуре 36,5 °С пересеивали в пробирки, содержащие

Таблица 1. Результаты изучения особенностей клинического проявления сибирской язвы в течение последних 20 лет (1991–2010 гг.) в Таджикистане

Течение болезни (в %)	Годы и виды животных								
	1991–2000				2001–2010				
	КРС	МРС	Лошади	Ослы	КРС	МРС	Лошади	Ослы	Олень
Молниеносное	23,9	40,5	–	–	21,7	26,7	–	–	–
Острое	35,7	30,9	33,3	–	26,4	29,4	18,1	–	–
Подострое	34	20,6	66,7	–	23,6	32,8	45,5	–	–
Хроническое	1,7	1,6	–	–	2,8	0,7	–	–	–
Атипичное	4,8	6,3	–	–	25,5	10,3	36,4	–	1
Всего (в %)	100	100	100	–	100	100	100	–	100

3,5–4,0 мл бульона Хоттингера. Через 5–6 ч инкубации бульонную культуру одного из исследуемых изолятов наносили бактериологической петлей на агаровую пластинку и растирали диаметром до 1,5 см. После подсушивания в центр пятна наносили каплю неразведенного бактериофага Fah ВНИИВВиМ и инкубировали при температуре 36–37 °С в течение 18 ч. Другие свойства изолятов также изучали по требованиям МУК 4.2.2413-08.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сравнительного изучения особенностей клинического проявления сибирской язвы в течение 1991–2000 и 2001–2010 гг. приведены в табл. 1.

По данным табл. 1 следует, что в последние 10 лет количество животных с выраженными клиническими признаками сибирской язвы уменьшилось, а регистрация атипичного течения заболевания среды животных по сравнению с прошлыми годами многократно увеличилась.

В целом, указанные ранее антропогенные факторы, иммунобиологические и физиологические показатели животных влияют на эпизоотический процесс и биологические свойства возбудителя сибирской язвы, а также на течение заболевания. Следует отметить, что атипичное течение сибирской язвы обуславливает длительное выделение возбудителя в окружающую среду и способствует его рассеиванию и рециркуляции в природе.

Для изучения биологических свойств возбудителя комплексными бактериологическими методами нами

были исследованы 98 изолятов *Bac. anthracis*, выделенных от животных, 17 изолятов из почвы и 5 изолятов из проб кожаного сырья от вынужденно забытых животных. Все выделенные культуры проверены комплексными бактериологическими исследованиями и были дифференцированы от сапрофитных бацилл. Для дифференциации сибиреязвенного микроба от почвенных бацилл использовали его чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу и пенициллину (феномен «жемчужного ожерелья») и реакцию преципитации (РП). Учитывали характер роста изолятов на кровяном агаре и на среде с молоком и результаты биопробы на лабораторных животных. Результаты изучения основных биологических свойств культур приведены в табл. 2.

Анализ полученных данных показывает, что возбудитель сибирской язвы животных – *Bac. anthracis*, в отличие от почвенных бацилл, в мазках из исходного патологического материала и питательных средах имел капсулу, на МПБ рос хорошо с образованием осадка на дне пробирки в виде хлопьев, при этом через 18–24 ч бульон становился прозрачным, кровяной агар не гемолизировал. Изоляты были патогенны для белых мышей, морских свинок и кроликов. При этом белые мыши погибали на 1–2 сут., морские свинки – на 2–3 сут., а кролики – на 2–3 сут., иногда на 3–4 сут. после заражения. Тогда как некоторые почвенные бациллы были патогенными только для белых мышей, которые погибали при внутрибрюшинном введении им очень больших доз.

Таблица 2. Результаты изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы

Свойства	Бациллы	
	<i>B. anthracis</i>	Почвенные бациллы
Капсулообразование	+	–
Подвижность	–	+
Гемолитическая активность	–	+
Тесты: «жемчужное ожерелье» фаголизабельность	+	–
Биопроба на лаб. животных: белые мыши морские свинки	+	+
РП	+	–

ANTHRAX SPECIFIC CLINICAL SIGNS AND THE DISEASE AGENT BIOLOGICAL PROPERTIES

A.A. Muminov¹, M.A. Anoyatbekov²

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), SPE «Biological Preparations», TAAS, Dushanbe, e-mail: anuminov@list.ru

² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, SPE «Biological Preparations», TAAS, Dushanbe

SUMMARY

The paper sums up findings on antropogenic factor effect on anthrax clinical signs and biological properties under the hot climatic conditions. Atypical clinical course of the disease induces durable agent shedding in the environment and facilitates its spread and recirculation in nature. It was determined that all detected *Bacillus anthracis* isolates demonstrated high level of pathogenicity. Herewith the maximal level was reported for isolates recovered from cattle, sheep and goats.

Key words: anthrax, clinical signs, animals, antropogenic factors, biological properties.

INTRODUCTION

As soon as anthrax agent enters soil, grass, feed and water with blood, urine or feces it sporulates. Animals become infected and diseased while they swallow anthrax spores with feed, water, soil as well as due to bites of gadflies, horn flies, mosquitoes and midges, who contacted with diseased animals or contaminated environment. There are 3 stages of anthrax disease course: peracute, acute and subacute. Chronic and atypical disease course is also reported in farm and wild animals [4, 5, 6].

In many countries anthrax is a continuous problem for public health and agriculture [2, 4, 5]. In the Republic of Tajikistan sporadic anthrax cases are repeatedly reported in animals and humans [1, 3]. Along with typical *Bac. anthracis* species a number of atypical agents circulate, who differ in their phenotypic and genetic properties. This is indicative of high flexibility of anthrax agent genome and of its significant potential for rapid alteration under biotic and abiotic factors leading to modification of some or other microbial properties. Some researchers report [6, 7] that frequency of atypical strain isolation is approximately equal to the frequency of isolation of the strains mistakenly identified as *Bac. anthracis*. This fact is accounted for common properties of *Bac. anthracis* and closely related *Bacillus* genus microorganisms thus significantly complicating their identification. In the end of 90-s-beginning of 2000-s anthrax agent biology and disease clinical course changed in Tajikistan due to wide spread of broad-spectrum and extended release antibiotics, disinfectants, use of serotherapy and chemotherapy in animal production as well as due to application of various preparations for locust control in piedmont and valley areas of Tajikistan. Therefore, in recent years in the majority of farm animals the disease was latent thus complicating life-time diagnosis. All these precondition the need for further examination of biological and genetic properties

of the anthrax agent.

The study was aimed at examination of factors affecting the disease clinical manifestation in animals, at biology of virulent and avirulent isolates of the anthrax agents recovered in Tajikistan and at determination of intraspecies differences using routine and additional examination tools.

MATERIALS AND METHODS

The research objects were farm animals of various species and ages and *Bac. anthracis* isolates recovered from animals, hides and soil. Anthrax clinical signs in animals were analyzed based on practical experience of veterinary experts and on results of examination performed using routine methods. Biological properties were examined according to the requirements of MUK 01.09.86 «Anthrax Laboratory Diagnosis in Animals and Humans, Agent Detection in Animal Raw Materials and Environmental Objects» and MUK 4.2.2413-08 «Anthrax Laboratory Diagnosis and Agent Detection», which suggest *Bac. anthracis* lysability by bacteriophages to be one of the basic tests for *Bac. anthracis* strain identification.

Diagnostic liquid anthrax bacteriophage Fah VNIIVViM produced by SSI ARRI of Veterinary Virology and Microbiology (Pokrov) was used for the isolate identification. Preparation of anthrax Fah VNIIVViM bacteriophage contained $1,2 \times 10^9$ of phage particles/ml, pH 7,1. The preparation specific activity and specificity were examined by cultivating test isolates in Petri dishes with Hottinger's agar, pH 7,2+0,1. In 24 hours of incubation at 36,5°C the grown culture was subcultured in tubes with 3,5–4,0 ml of Hottinger's broth. In 5–6 hours of cultivation the broth culture of one of the test isolates was applied to the agar plate using inoculation loop and spread over the area of up to 1,5 cm in diameter. Following drying a drop of undiluted Fah VNIIVViM bacteriophage was applied in the center of the spot and incubated for 18 hours at 36–37°C. Other properties of the isolates were also examined according to the requirements of MUK 4.2.2413-08.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of comparative examination of anthrax clinical signs performed during 1991–2000 and 2001–2010 are demonstrated in Table 1.

Table 1 demonstrates that over the last 10 years the number of animals with expressed anthrax clinical signs decreased, while the number of reports on atypical disease course increased manifold as compared to the previous years.

Altogether the above mentioned antropogenic factors, immunobiological and physiological properties of the animals have an effect on the epidemic process and anthrax agent's biological properties as well as on the

Установлено, что все выделенные изоляты *Bac. anthracis* обладали высокой степенью патогенности, при этом максимальная степень отмечена у изолятов, выделенных от крупного рогатого скота, овец и коз. При этом возбудители, выделенные от разных видов животных, по культуральным и морфологическим свойствам были идентичны, а выделенные микробы-сапрофиты имели отличия от них. Некоторые культуры, полученные из почвы, были авирулентными и не образовывали капсулу (восстановить свойства, характерные для штаммов *Bac. anthracis*, удалось лишь после 6–8 «слепых пассажей»), другие же имели пониженную вирулентность (белые мыши погибали на 9–10, иногда на 11–12 сут.). Однако они сохраняли способность к спорообразованию, антигенные и биохимические свойства. Бациллы сибирской язвы, выделенные из почвы, имели разнообразные морфологические формы: веретенообразные, булабовидные, колбообразные, вздутые, грушевидные и т.д. Все сибиреязвенные штаммы были патогенны для белых мышей. Для идентификации изолятов (фаголизательности) *Bac. anthracis* в качестве дополнительного теста использовали бактериофаг Fah VNIIVViM. Продолжительность анализа с учетом подготовки изолятов составила около 30 ч. Результаты учитывали предварительно через 5–6 ч и окончательный учет проводили через 18–20 ч путем визуального просмотра невооруженным глазом участков нанесения культуры исследуемого изолята и бактериофага. Через 5–6 ч инкубации в чашках с посевами на месте нанесения культуры с бактериофагом пятна лизиса были полупрозрачными или полностью прозрачными. Через 18–20 ч отмечался полный лизис культур с прозрачным дном литического пятна или с единичными колониями вторичного роста. Положительной считали пробу при степени лизиса не менее чем в 3 креста. В результате исследования выявлено, что 89 % от общего числа исследуемых культур были чувствительны к бактериофагу. В последние годы специалистами НПП «Биологические препараты» ТАСХН для ускорения диагностики и идентификации возбудителя сибирской язвы были разработаны различные модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этой цели использовались тест-системы с праймерами к генам протективного антигена, контролируемого геном плазмид rX01 (747 п.н) и капсульного протеина, кодируемого геном плазмид rX02 (264 п.н). При помощи ПЦР-анализа удается обнаружить больше позитивных проб из патологического материала, почвы и воды, чего не удавалось достичь при посеве на селективные среды для *Bac. anthracis*. Но из-за дороговизны праймеров и других компонентов не всегда удается использовать ПЦР-анализы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования и их анализ показывают, что в последние годы количество животных с выраженными клиническими признаками сибирской язвы уменьшилось, а регистрация атипичного течения заболевания среды животных по сравнению с прошлыми годами многократно увеличилась. Данные исследований показывают, что данный факт связан с воздействием биотических и абиотических факторов, приводящих к изменению тех или иных свойств возбудителя. Также немаловажное значение имеют иммунобиологические и физиологические показатели животных.

Следует отметить, что атипичное течение сибирской язвы обуславливает длительное выделение воз-

будителя в окружающую среду и способствует его рассеиванию и рециркуляции в природе. Проведенные исследования и анализы показывают, что в условиях Таджикистана бациллы сибирской язвы обладают большой вариабельностью, что затрудняет постановку правильного диагноза у сельскохозяйственных животных, особенно при исследовании почвы на наличие *Bac. anthracis*. Выделение из организма животного слабовирулентных и апатогенных штаммов зачастую ставит в затруднительное положение бактериологов при окончательной постановке диагноза сибирской язвы. В связи с этим, наряду с методами ускоренной индикации и идентификации, появляется необходимость изучать дополнительные свойства такими основными идентификационными тестами, как обнаружение капсулы в мазках из свежего материала или из приготовленных культур, выращенных на питательных средах, гемолиз, чувствительность к пенициллину, подвижность и проба с бактериофагом. Это позволит значительно улучшить диагностику при идентификации типичных и атипичных штаммов *Bac. anthracis*.

Использование традиционных методов для диагностики сибирской язвы хотя и является трудоемким, но до настоящего времени остаётся наиболее доступным. Одним из эффективных методов индикации и идентификации *Bac. anthracis* является ПЦР, с помощью которой удается обнаружить больше позитивных проб из патологического материала, почвы и воды, чего не удавалось достичь при посеве на селективные среды для *Bac. anthracis*. Но из-за дороговизны праймеров и других компонентов не всегда удается использовать ПЦР-анализы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибиотикочувствительность, биотиповая и генетическая характеристика изолированных в различных регионах Таджикистана / С. Саторов [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008. – Т. 6. – С. 223–228.
2. Маринин Л.И., Тюрин Е.А. Опасность заноса (завоза) сибирской язвы из зарубежных стран // Матер. VIII Межгосударст. науч.-практ. конф. государственных участников СНГ. – Саратов, 2007. – С. 79–81.
3. Муминов А.А. Современная эпизоотическая ситуация по сибирской язве в Таджикистане // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2011. – Т. 207. – С. 16–21.
4. Нахмансон В.М., Бурба Л.Г. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Справочник. – М.: Росагропромиздат, 1990. – 255 с.
5. Сибирская язва сельскохозяйственных животных / Н.Г. Ипатенко [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1987 – 256 с.
6. Типирование штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл с помощью умеренных бактериофагов / П.Г. Васильев, Ю.И. Иванов, А.В. Сенькин [и др.] // Матер. юбилейн. науч. конф., посвящ. 50-летию Центра военно-технических проблем биологической защиты НИИ микробиологии МО РФ. – Екатеринбург, 1999. – С. 35–36.
7. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл / Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, А.Г. Рязанова [и др.] // Журн. гиг., эпид., микробиол. и иммунолог. – 2009. – № 3. – С. 76–80.

Table 1. Examination of anthrax clinical sign specificity over the last 20 years in Tajikistan (1991-2010)

Disease course (%)	Animal species and year of testing								
	1991–2000				2001–2010				
	Cattle	Small ruminants	Horses	Donkeys	Cattle	Small ruminants	Horses	Donkeys	Deer
Peracute	23,9	40,5	–	–	21,7	26,7	–	–	–
Acute	35,7	30,9	33,3	–	26,4	29,4	18,1	–	–
Subacute	34	20,6	66,7	–	23,6	32,8	45,5	–	–
Chronic	1,7	1,6	–	–	2,8	0,7	–	–	–
Atypical	4,8	6,3	–	–	25,5	10,3	36,4	–	1
Total (%)	100	100	100	–	100	100	100	–	100

disease course. It is worth mentioning that atypical disease induces durable agent shedding in the environment and facilitates its spread and recirculation in nature.

In order to examine the agent's biological properties using bacteriological methods we tested 98 *Bac. anthracis* isolates from animals, 17 isolates from soil and 5 isolates from hides of emergently slaughtered animals. All recovered cultures were tested using complex bacteriological methods and they were differentiated from saprophytic bacilli. Anthrax microbe's sensitivity to anthrax bacteriophage and penicillin (pearl-string-necklace phenomenon) and precipitation test (PT) were used for differentiation of the anthrax microbe from soil bacilli. Type of the isolate growth in blood agar and in milk-containing medium as well as bioassay results were also taken into consideration. Examination results of the cultures' basic biological properties are shown in Table 2.

Analysis of the obtained data demonstrated that as distinct from soil bacilli animal anthrax agent – *Bac. anthracis* – had a capsule in original pathological material smears and in media, it demonstrated good growth abilities in beef-extract broth with flake-like sediment formation at the tube bottom. Herewith, in 18–24 hours the broth became transparent and blood agar demonstrated no hemolysis. The isolates were pathogenic for white mice, guinea pigs and rabbits. White mice died on day 1–2, guinea pigs – on day 2–3 and sometimes on day 3–4 post infection, whereas some soil bacilli were pathogenic only for white mice, who died

following intraperitoneal administration of very high doses.

It was demonstrated that all recovered *Bac. anthracis* isolates possessed a very high pathogenicity level with maximal level being reported for the isolates from cattle, sheep and goats. Herewith, agents isolated from different animal species were similar as for their cultural and morphologic properties and saprophyte microbes differed from them. Some cultures obtained from soil were avirulent and formed no capsule (properties typical for *Bac. anthracis* were managed to be reproduced only following 6-8 "blind passages"), the other demonstrated lower virulence (white mice died on day 9–10 and sometimes on day 11–12). Nevertheless they preserved their ability for sporogenesis as well as antigenic and biochemical properties. Anthrax bacilli isolated from soil demonstrated various morphologic shapes: fusiform, claviform, flask-shaped, convex, pear-shaped, etc. All anthrax strains were pathogenic for white mice. Fah VNIIBBIM bacteriophage was used as an additional test for *Bac. anthracis* isolate identification (phage lysability). The test duration including isolate preparation amounted to about 30 hours. The results were preliminarily read in 5-6 hours and the final reading was made in 18–20 hours by visual examination of the sites of test isolate and bacteriophage inoculation. In 5–6 hours of incubation lysis spots were semi-transparent or completely transparent in the dishes with cultures at the site of bacteriophaged culture inoculation. Complete lysis of cultures with

Table 2. Examination of biological properties of anthrax agent

Properties	Бациллы	
	<i>B. anthracis</i>	Soil bacilli
Capsule formation	+	–
Motility	–	+
Hemolytic activity	–	+
Tests: «pearl-string-necklace» phage lysability	+	–
Bioassay in laboratory animals: white mice guinea pigs	+	+
PT	+	–

transparent bottom of lytic spot or with singular colonies of secondary growth were reported in 18–20 hours. The sample was considered positive at lysis level of at least ++++. Examination results demonstrated that 89% of total tested cultures were sensitive to bacteriophage. Recently the TAAS SPE «Biological Preparations» experts developed various modifications of polymerase chain reaction (PCR) for anthrax agent rapid diagnosis and identification. Test-systems with primers to genes of protective antigen controlled with pX01 plasmid gene (747 b.p.) and to genes of capsule protein encoded for pX02 plasmid gene (264 b.p.) were used for this purpose. PCR aids to identification of larger number of positive samples of pathological materials, soil and water and that was impossible during cultivation in *Bac. anthracis* selective media. But due to high price of primers and other components PCR analysis is not used routinely.

CONCLUSION

Therefore, the performed examinations and their analysis demonstrate that in recent years the number of animals with expressed anthrax clinical signs has decreased, while reports on atypical disease in animals have manifold increased as compared to the previous years. Examination data indicate that such fact is related to biotic and abiotic factor effect resulting in modification of some or other physiological parameters of animals.

It is worth mentioning that atypical anthrax disease course induces durable agent shedding in the environment and facilitates its spread and recirculation in nature. Examinations and tests performed demonstrate that in Tajikistan anthrax bacilli are highly variable and thus correct diagnosis in farm animals is complicated especially during soil examination for *Bac. anthracis*. Isolation of low virulent and apathogenic strains from animals is often difficult for bacteriologists as for final anthrax diagnosis. In this respect, in addition to the methods of rapid indication and identification it's necessary to examine additional properties using such basic identification tests as detection of capsule in fresh material smears or in prepared cultures grown in nutrition media; hemolysis, sensitivity to penicillin, motility and bioassay with bacteriophage. This will aid to significant

improvement of diagnosis during identification of typical and atypical *Bac. anthracis* strains.

Thought use of routine methods for anthrax diagnosis is labor consuming currently it is the most affordable method. One of the effective methods for *Bac. anthracis* indication and identification is PCR aiding to detection of larger amount of positive samples of pathological materials, soil and water, which is impossible at cultivation in selective media for *Bac. anthracis*. Unfortunately, due to high price of primers and other components PCR tests cannot be used routinely.

REFERENCES

1. Sensitivity to Antibiotics, Biotype and Genetic Properties of *Bacillus Anthracis* Isolated in Different Regions of Tajikistan / S. Satorov [et al] // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health. – Vladimir, 2008. – Vol. 6. – P. 223–228.
2. Marinin L.I., Tyurin E.A. Risk of Anthrax Introduction from Foreign Countries // Proceedings of the VIII Interstate Research Conference of the CIS Member Countries. – Saratov, 2007. – P. 79–81.
3. Muminov A.A. Current Anthrax Epidemic Situation in Tajikistan // Proceedings KSAVM. – Kazan, 2011. – Vol. 207. – P. 16–21.
4. Nakhmanson V.M., L.G. Burba. Differential Diagnosis of Farm Animal Infectious Diseases. Reference Book. – M.: Rosagropromizdat, 1990. – 255 p.
5. Anthrax in Farm Animals / N.G. Ipatenko [et al]. – M.: Agropromizdat, 1987. – 256 p.
6. Typing of *B. anthracis* Strains and Closely Related Bacilli Using Moderate Bacteriophages / P.G. Vasilyev, Yu.I. Ivanov, A.V. Senkin [et al] // Proceedings of Commemorative Research Conference Devoted to the 50th Anniversary of the Center for Military and Technical Issues of Biosecurity of the RI of Microbiology of the RF MoD. – Ekaterinburg, 1999. – P. 35–36.
7. Improvement of Methods for Identification of Atypical Strains of the Anthrax Agent and their Differentiation from Closely Related Bacilli / E.I. Yeryomenko, O.I. Tsygankova, A.G. Ryazanova [et al] // J. Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. – 2009. – № 3. – P. 76–80.

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА I И II ТИПА С ПОМОЩЬЮ ПЦР

А.П. Герилович¹, Б.Т. Стегний², И.В. Горайчук³, А.С. Солодянкин⁴, В.И. Болотин⁵

¹ и.о. заместителя директора, доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков, Украина, e-mail: antger@rambler.ru

² директор, доктор ветеринарных наук, профессор, академик НААН Украины, ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков, Украина

³ младший научный сотрудник, ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков, Украина

⁴ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков, Украина

⁵ кандидат ветеринарных наук, ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков, Украина

РЕЗЮМЕ

В работе использованы вирусы диареи крупного рогатого скота I и II типа. Участок гена E^{ms}, полученный с помощью полимеразной цепной реакции, был интегрирован в вектор для клонирования (pTZ57R/T). Кроме того, бактерии *E. coli* DH10B были трансформированы для наработки рекомбинантных плазмид. Наличие вставки гена E^{ms} было проверено с помощью рестрикционного анализа. В ходе проведенных исследований были сконструированы рекомбинантные плазмиды, которые несут вставку фрагмента гена E^{ms} возбудителей вируса диареи крупного рогатого скота I и II генотипа, длиной 826 пар нуклеотид.

Ключевые слова: вирусная диарея крупного рогатого скота, ген E^{ms}, полимеразная цепная реакция, клонирование, pTZ57R/T, рестриктазы.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус диареи крупного рогатого скота (ВД КРС) относится к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* [3]. Возбудитель представлен двумя генотипами – I и II, обозначаемыми как BVDV-1 и BVDV-2. Представителями данного рода также являются возбудители классической чумы свиней и пограничной болезни овец. Все пестивирсы гомологичны по генетической и антигенной структуре. В то время как естественным патогеном КРС является BVDV-1 и BVDV-2, овцы могут быть заражены как пестивирсами КРС, так и возбудителем пограничной болезни овец, а свиньи могут быть инфицированы всеми четырьмя пестивирсами, хотя наиболее опасное заболевание у них связано с вирусом классической чумы свиней [1].

Пестивиральный геном представлен позитивно-полярной одноцепочечной линейной РНК, имеющей длину около 12,3 тыс. нуклеотидных остатков, включающей одну открытую рамку считывания (ORF), которая кодирует полипротеин, состоящий из 4000 аминокислотных остатков [5]. Открытая рамка считывания с обоих концов фланкирована нетранслируемыми областями (UTR). Нуклеокапсидный протеин С и гликопротеины E^{ms}, E1 и E2 являются структурными компонентами вириона [2]. E^{ms} и E2 отвечают за введение и формирование нейтрализующих антител и способствуют выработке антител к ВД КРС. Значительное количество E^{ms} также секретируется в клеточных культурах.

ВД КРС характеризуется абортными, рождением слабых нежизнеспособных телят с врожденными уродствами, респираторными заболеваниями, тромбоцитопенией, болезнью слизистых оболочек, что приносит существенный ущерб промышленному животноводству. В то время как штаммы ВД ВРХ I обычно вызывают легкую форму диареи у иммунного скота, некоторые штаммы ВД ВРХ II являются сильно вирулентными и приводят к развитию тяжелой тромбоцитопении, множественным кровоизлияниям и воспалительным процессам на слизистых оболочках [6].

В связи с увеличением объемов использования клеточных биотехнологий возрастает риск контаминации их продукции вирусами. На сегодняшний день большое значение имеют методы контроля сырья животного происхождения, а также готовых препаратов по стерильности и исключению контаминации посторонними вирусами.

Важной практической задачей для скрининга контаминации пестивиралами является исключение использования культуры вируса в качестве положительного контроля. Учитывая это, целью данной работы было конструирование рекомбинантного плазмидного вектора, несущего вставку участка гена E^{ms} возбудителя ВД КРС I и II типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы крови на фильтровальной бумаге, которые содержали ВД ВDV-1 генотипа 1b (штамм Ossloss) и BVDV-2 (штамм Kosice) были любезно предоставлены профессором Стефаном Вильчеком (Университет ветеринарной медицины и фармации Кошице, Республика Словакия).

Экстракцию нуклеиновых кислот с фильтровальной бумаги проводили с помощью метода аффинной сорбции [4]. Обратную транскрипцию с целью получения кДНК на матрице РНК и амплификацию осуществляли с использованием коммерческих наборов «GenePakMasterMix RT-PCR Core» и «GenePakMasterMix PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) соответственно.

Праймеры P1: 5'-AACAAACATGGTTGGTCAACTGGT-3' и P2: 5'-CTTACACAGACATATTTGCCTAGGTTCCA-3', разработанные Д.Ж. Салливаном с соавторами [7], использовались для полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации участка гена E^{ms} при следующем температурном режиме: предварительная денатурация (94 °C, 2 мин), 35 циклов денатурации (94 °C, 1 мин), отжига праймеров (55 °C, 1 мин), элонгации (72 °C, 1 мин) и финальной элонгации (72 °C, 10 мин) в термоциклере Biometra T3000. Анализ результатов ПЦР проводили в лучах УФ-света после электрофореза в 1% агарозном геле с бромистым этидием при силе тока 30 mA и напряженности 15 V/cm.

Ампликоны экстрагировали из геля, используя коммерческий набор «Silica Bead DNAGel ExtractionKit» (Fermentas, Литва). Элюированную кДНК путем лигирования встраивали в плазмидный вектор pTZ57R/T, следуя инструкции производителя («Ins TA clone PCRC loning Kit», Fermentas, Литва). Для этого 10 мкл кДНК, элюированной из одного ПЦР-продукта, смешивали с 3 мкл ТА-вектора и 1 мкл T4 лигазы. Лигазная смесь инкубировалась 16 ч при 4 °C.

Бактерии *E. coli* DH10B использовались в качестве клеток-хозяев для клонирования плазмиды. Стоковые культуры хранились при -70 °C в 25 % глицерине. Все клеточные культуры выращивались в LB-среде при 37 °C в шейкер-инкубаторе. Для встраивания рекомбинантного вектора в компетентные клетки использовали коммерческий набор «Ins TA clone PCRC loning Kit» (Fermentas, Литва). Трансформированные клетки *E. coli* штамма DH10B выращивали в чашках Петри при 37 °C с ампициллиновой LB-средой.

Был проведен скрининг трансформированных бактериальных колоний на наличие рекомбинантных плазмид методом ПЦР с использованием праймеров P1/P2 и M13/pUC_F/R. Плазмидная ДНК была экстрагирована из рекомбинантной культуры клеток *E. coli* с помощью коммерческого набора «Plas mid Miniprep Kit» (GeneJET, Литва). Вставка кДНК в плазмиды также была подтверждена рестрикционным анализом с помощью рестрикционных эндонуклеаз *EcoRI* и *HindIII* в буфере B2 (JenaBioscience, Германия). Для подтверждения наличия вставки, смесь из 2 мкл 10x буфера B2,

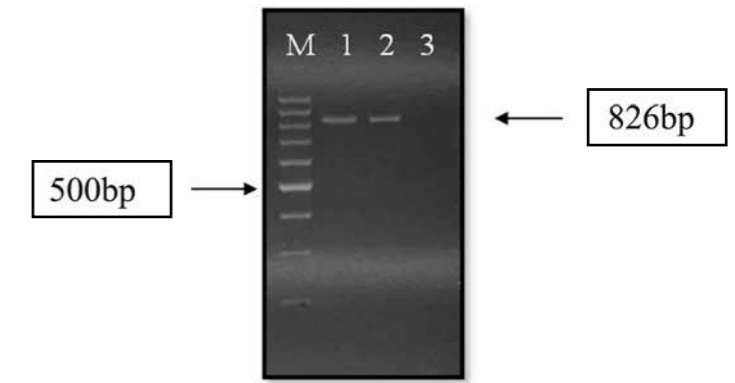


Рис. 1. Электрофорезграмма результатов амплификации к ДНК ВД КРС с праймерами P1/P2. М – маркер молекулярной массы (100 bp DNA Ladder, ООО «Лаборатория Изоген», Россия); 1 – BVDV 1; 2 – BVDV 2; 3 – отрицательный контроль.

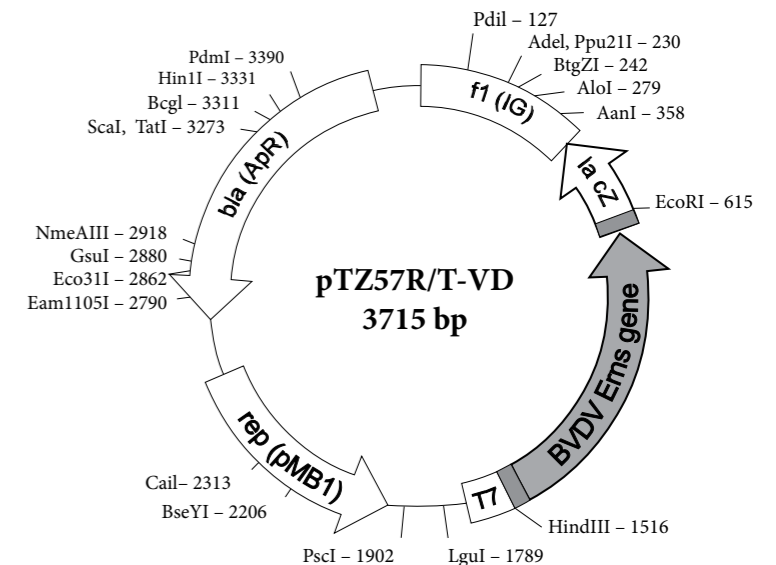
14 мкл H₂O, 2 мкл продукта и 2 мкл рестрикционных эндонуклеаз инкубировали при 37 °C в течение 16 ч, с последующей инактивацией прогреванием при 65 °C в течение 20 мин, после чего результаты учитывались с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведенной работы вирусная РНК из двух образцов крови на фильтровальной бумаге была использована в качестве матрицы для получения к ДНК в реакции обратной транскрипции, с последующим проведением амплификации методом ПЦР. При учете результатов амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле наблюдались специфические полосы предполагаемой длины в 826 п.н. для участка гена E^{ms} (рис. 1).

Экстрагированные из агарозного геля ПЦР продукты затем встраивали в вектор для клонирования pTZ57R/T. Сконструированные плазмиды pTZ57R/T-VD1 и pTZ57R/T-VD2 (рис. 2) имели в своем составе фрагмент гена E^{ms}, селективный ген β-лактамазы

Рис. 2. Карта сайтов рестрикции плазмиды pTZ57R/T-VD



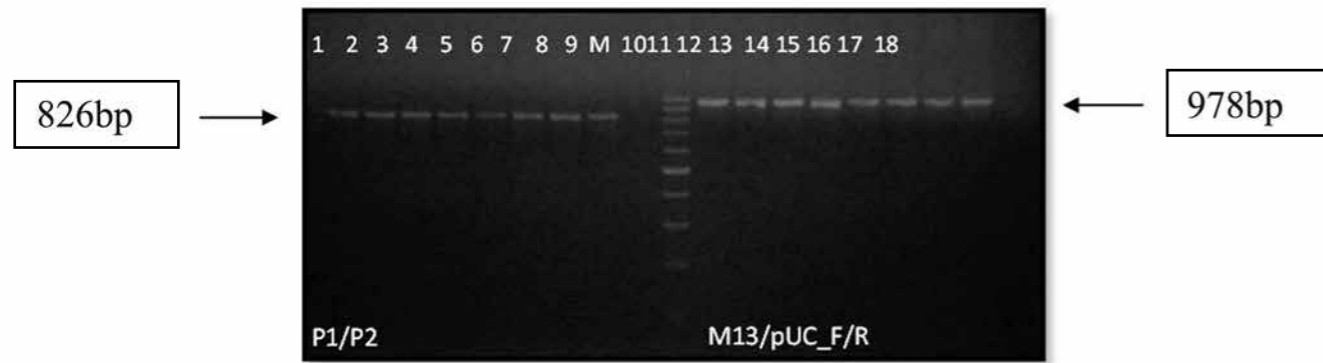
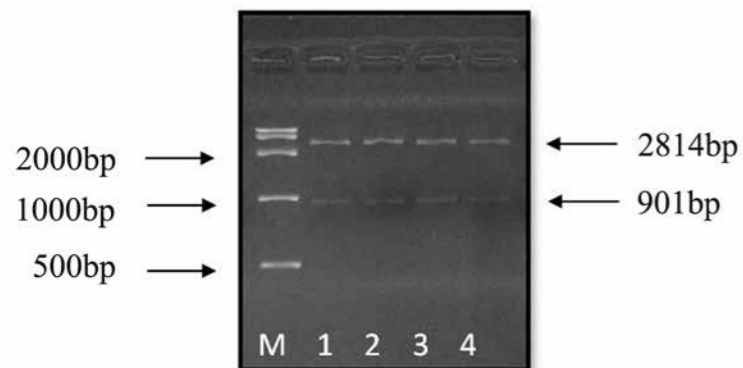


Рис. 3. Электрофореграмма результатов амплификации с праймерами P1/P2 и M13/pUC_F/R в агарозном геле
1–4, 10–13 – рекомбинантные колонии, несущие вставку гена E^{ms} ВД КРС I типа;
5–8, 14–17 – рекомбинантные колонии, несущие вставку гена E^{ms} ВД КРС II типа;
9, 18 – отрицательный контроль;
M – маркер молекулярной массы (100 bp DNA Ladder, ООО «Лаборатория Изоген», Россия).

(bla(ApR)), обеспечивающий устойчивость к ампициллину, нуклеотидную последовательность, комплементарную праймерам M13/pUC, для последующего отбора клеток, содержащих рекомбинантные молекулы.

Две рекомбинантные плазмиды клонированы в клетках *E. coli* DH10B. Скрининг рекомбинантных колоний *E. coli* осуществлялся высевом колоний на селективную среду с ампициллином. Для исключения часто наблюдаемых при клонировании артефактных ДНК-структур и комплексов встраиваемых ампликонов, а также возможных нарушений структуры плазмидной ДНК был проведен ПЦР-скрининг всех колоний *E. coli* с приобретенной резистентностью к ампициллину. Таким образом был проведен скрининг восьми рекомбинантных колоний с использованием праймеров P1/P2 и M13/pUC_F/R, который подтвердил наличие вставки во всех колониях (рис. 3).

Рис. 4. Электрофореграмма рестрикционного анализа плазмиды pTZ57R/T-VD
1–2 – рекомбинантные колонии, несущие вставку гена E^{ms} ВД КРС I типа;
3–4 – рекомбинантные колонии, несущие вставку гена E^{ms} ВД КРС II типа;
M – маркер молекулярной массы (Fast Ruler High Range DNA Ladder, Fermentas, Лумва).



Расположение вставки в четырех рекомбинантных колониях было подтверждено с помощью рестрикционного анализа с использованием рестрикционных эндонуклеаз *EcoR* I и *Hind* III, которые режут плазмиду в соответственных сайтах рестрикции. После рестрикции в агарозном геле наблюдалось наличие двух фрагментов ожидаемой длины в 2814 и 901 п.н. (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате были подтверждены наличие и корректность вставки рекомбинантных плазмид pTZ57R/T-VD в клетки *E. coli* DH10B. В ходе проведенной работы была получена культура рекомбинантных клеток *E. coli*, несущих вставку фрагмента гена E^{ms} длиной 826 п.н.

Авторы выражают глубокую благодарность профессору Стефану Вильчеку (Университет ветеринарной медицины и фармации Кошице, Республика Словакия) за любезно предоставленные образцы ВД КРС 1b (штамм Ossloss) и ВД КРС II типа (штамм Kosice).

Работа выполнена при поддержке Swiss National Science Foundation, Project SCOPES NF number IZ730Z0_128050: «Epidemiology of BVD in Ukraine: Development of a control program» с 2011 по 2012.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses / M. Baxi, D. McRae, S. Baxi [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2006. – Vol. 116. – P. 37–44.
2. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus / H.-J. Thiel, R. Stark, E. Weiland [et al.] // *J. Virol.* – 1991. – Vol. 65. – P. 4705–4712.
3. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains associated with severe outbreaks and high mortalities / C. Pellerin, J. van den Hurk, J. Lecomte, P. Tjissen // *Virology.* – 1994. – Vol. 203. – P. 260–268.
4. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids / R. Boom, C. Sol, M. Salimans [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28, № 3. – P. 495–503.
5. Rice C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication* // *Fields Virology*. – 3rd ed. – Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996. – P. 931–959.
6. Ridpat J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes // *J. Virol.* – 1994. – Vol. 205. – P. 66–74.
7. Sullivan D.G., Akkina R.K.A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses // *Virus Res.* – 1995. – Vol. 38. – P. 231–239.

UDC 619:616.98:577.2

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT POSITIVE CONTROL OF TYPE I AND II BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS BY PCR

A.P. Gerilovich¹, B.T. Stegny², I.V. Goraichuk³, A.S. Solodyankin⁴, V.I. Bolotin⁵

¹ Acting Deputy Director, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, NSC «IECVM», Kharkov, Ukraine, e-mail: antger@rambler.ru

² Director, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Member of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, NSC «IECVM», Kharkov, Ukraine

³ Junior Researcher, NSC «IECVM», Kharkov, Ukraine

⁴ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), NSC «IECVM», Kharkov, Ukraine

⁵ Candidate of Science (Veterinary Medicine), NSC «IECVM», Kharkov, Ukraine

SUMMARY

Type I and II bovine viral diarrhoea viruses were used for the work. E^{ms} gene fragment obtained using polymerase chain reaction was inserted in the cloning vector (pTZ57R/T). In addition, *E. coli* DH10B bacteria were transformed for recombinant plasmid uptake. Presence of gene E^{ms} insertion was confirmed using restriction analysis. During the studies recombinant plasmids carrying 826 bp E^{ms} gene insertion of genotypes I and II bovine viral diarrhoea virus were constructed.

Key words: bovine viral diarrhoea, E^{ms} gene, polymerase chain reaction, cloning, pTZ57R/T, restriction enzymes.

INTRODUCTION

Bovine viral diarrhoea virus belongs to *Pestivirus* genus of *Flaviviridae* family [3]. The agent is represented by two genotypes – I and II which are designated as BVDV-1 and BVDV-2. Representatives of the genus also cause classical swine fever and border disease. All pestiviruses are homologous by their genetic and antigenic structure. While BVDV-1 and BVDV-2 are natural pathogens of cattle, sheep can be infected by both bovine pestiviruses and border disease agent and pigs can be affected by all four pestiviruses, though the most dangerous disease in pigs is associated with classical swine fever virus [1].

The Pestivirus genome is a ~12,3 kbp positive sense single-stranded RNA including one open reading frame (ORF) coding for the 4000 amino-acid residue polyprotein [5]. The open reading frame is flanked on both sides by untranslated regions (UTR). Nucleocapsid protein C and glycoproteins E^{ms}, E1 and E2 are structural components of the virion [2]. E^{ms} and E2 are responsible for the induction and formation of neutralizing antibodies and stimulate

production of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. A considerable amount of E^{ms} is also secreted in cell cultures.

Infection with bovine viral diarrhoea virus is characterized with abortions, delivery of weak, unviable calves with congenital defects, respiratory diseases, thrombocytopenia, mucosal disease which cause significant losses to animal industry. While BVDV-1 strains usually induce mild diarrhoea in immune cattle, several BVDV-2 strains are highly virulent and lead to the development of severe thrombocytopenia, multiple hemorrhages and inflammation of mucosa [6].

Increased use of cellular biotechnologies is associated with the elevated risk of virus contamination of cells. Currently, methods of control of raw animal materials and finished drugs for sterility and absence of foreign virus contamination has gained an utmost importance.

An important practical task for pestivirus contamination screening is the exclusion of use of virus culture as a positive control. Taking into account the abovementioned, this work was aimed at the construction of a recombinant plasmid vector carrying E^{ms} gene insertion of types I and II bovine viral diarrhoea virus.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples on filter paper containing genotype 1b BVDV-1 (Ossloss strain) and BVDV-2 (Kosice strain) of viral diarrhoea virus were kindly provided by Professor Stefan Vilcek (University of Veterinary Medicine in Kosice, Republic of Slovakia).

Nucleic acids from filter paper were extracted using affine sorption method [4]. Reverse transcription for the purpose of obtaining cDNA on RNA matrix and amplification was carried out using commercial kits «Gene Pak Master Mix RT-PCR Core» and «Gene Pak Master Mix PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Russia), respectively.

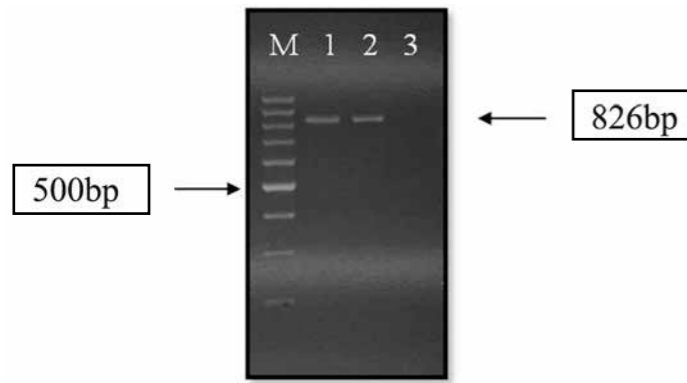
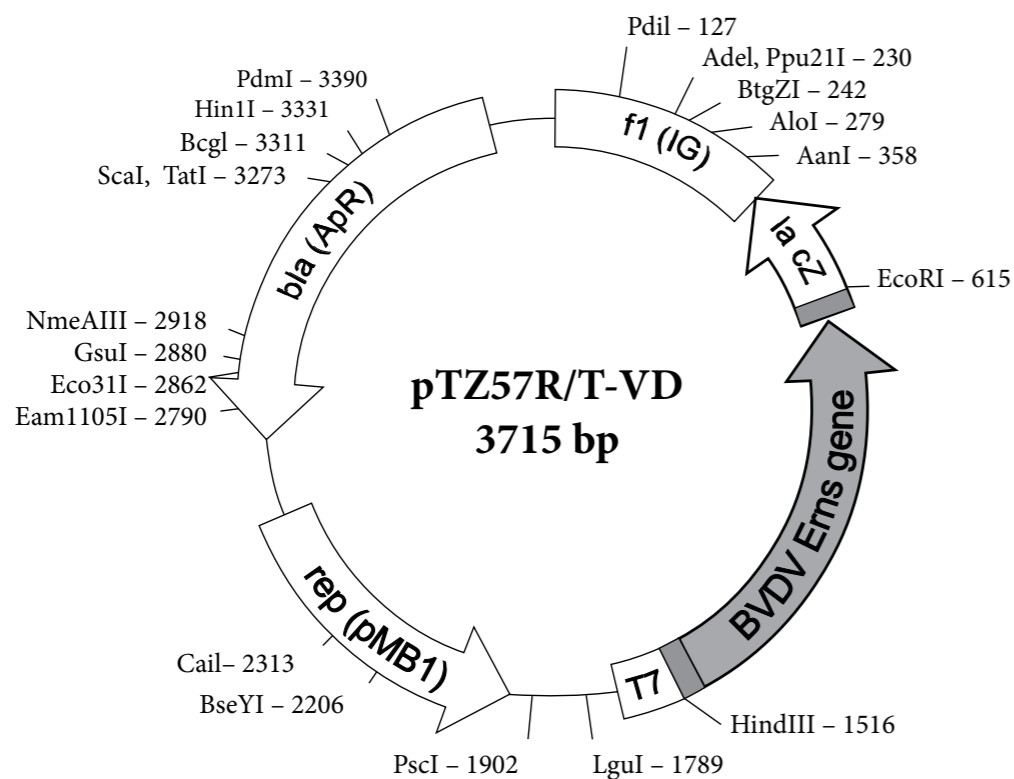


Fig. 1. Electrophoregram with BVDV cDNA amplification results using primers P1/P2
M – molecular weight marker (100 bp DNA Ladder, OOO «Laboratoriya Izogen», Russia);
1 – BVDV 1;
2 – BVDV 2;
3 – negative control.

Primers P1: 5'-AACAAACATGGTTGGTCAACTGGT-3' and P2: 5'-CTTACACAGACATATTTGCCTAGTTCCA-3' developed by Sullivan D.G. et al. [7], were used for PCR amplification of the Erns gene fragment with the following temperature regimen: preliminary denaturation (94 °C, 2 min), 35 denaturation cycles (94 °C, 1 min), primer annealing (55 °C, 1 min), elongation (72 °C, 1 min) and final elongation (72 °C, 10 min), in thermocycler Biometra T3000. Results of PCR assay were read in UV light after electrophoresis in 1% agarose gel containing ethidium bromide at the current of 30 mA and magnetic field strength of 15 V/cm.

Amplicons were extracted from the gel using the commercial kit «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» (Fermentas, Lithuania). The eluted cDNA was inserted by

Fig. 2. pTZ57R/T-VD plasmid restriction site map



ligation into the plasmid vector pTZ57R/T in accordance with the manufacturer's instructions («Ins TA clone PCR Cloning Kit», Fermentas, Lithuania). For this purpose 10 µL of cDNA eluted from one PCR product was mixed with 3 µL of TA-vector and 1 µL of T4 ligase. The ligase mixture was incubated for 16 hours at 4 °C.

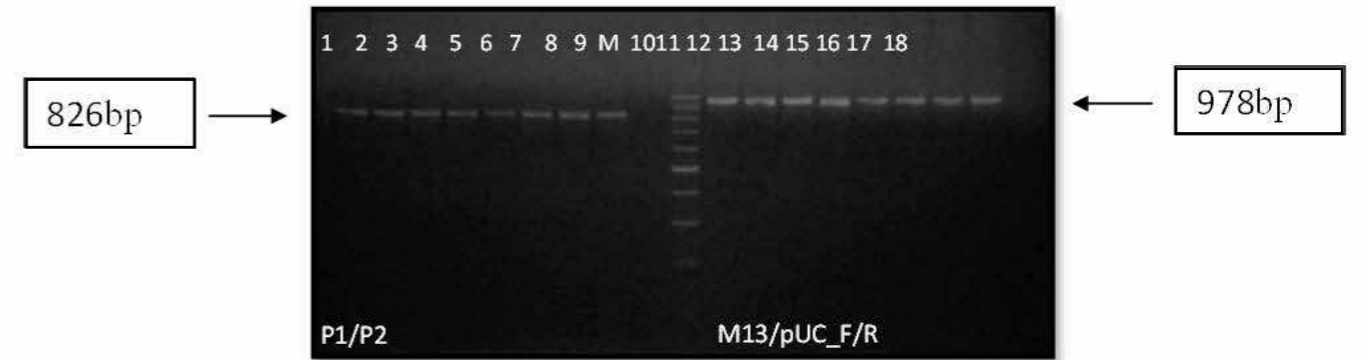
E. coli DH10B bacteria were used as host cells for plasmid cloning. Cell cultures stocks were stored at -70 °C in 25% glycerin. All cell cultures were grown in LB broth at 37 °C in the incubator shaker. The commercial kit «Ins TA clone PCR Cloning Kit» (Fermentas, Lithuania) was used for inserting the recombinant vector in competent cells. Transformed DH10B *E. coli* cells were grown in Petri dishes at 37 °C with LB broth containing ampicillin.

The transformed bacterial colonies were screened for the presence of recombinant plasmids by PCR using P1/P2 and M13/pUC_F/R primers. Plasmid DNA was extracted from recombinant *E. coli* cell culture using the commercial kit «Plasmid Miniprep Kit» (GeneJET, Lithuania). cDNA insertion in the plasmids was also confirmed by restriction analysis using restriction endonucleases *EcoRI* and *HindIII* in B2 buffer (JenaBioscience, Germany). To confirm the presence of the insertion the mixture containing 2 µL of 10xB2 buffer, 14 µL of dH₂O, 2 µL of the product and 2 µL of restriction endonucleases was incubated at 37 °C for 16 hours followed by its inactivation by heating at 65 °C during 20 minutes and reading results using electrophoresis in 1,5% agarose gel.

RESULTS AND DISCUSSION

At the first stage of the work conducted viral RNA from two blood samples on filter paper was used as a matrix for obtaining cDNA by reverse transcription assay followed by cDNA amplification by PCR. Amplification results were read by electrophoresis, specific lines of an estimated length of 825 bp indicative of E^{ms} gene fragment were observed in agarose gel (Fig. 1).

PCR products extracted from agarose gel were subsequently inserted in the cloning vector pTZ57R/T. The constructed plasmids pTZ57R/T-VD1 and pTZ57R/T-VD2



(Fig. 2) had a E^{ms} gene fragment, a selective β-lactamase gene (*bla*(Ap^R)) responsible for ampicillin resistance, nucleotide sequence complementary to M13/pUC primers for the subsequent selection of cells containing recombinant molecules.

Two recombinant plasmids were cloned in *E. coli* DH10B cells. Screening of recombinant *E. coli* colonies was performed by inoculating the colonies into the selective medium containing ampicillin. To exclude artifact DNA structures and incorporable amplicon complexes, as well as potential plasmid DNA structure damages commonly observed at cloning, PCR screening of all *E. coli* colonies with acquired resistance to ampicillin was performed. Thus, eight recombinant colonies were screened using P1/P2 and M13/pUC_F/R primers and the insertion was confirmed in all colonies (Fig. 3).

The insertion location in all recombinant colonies was confirmed by restriction analysis using restriction endonucleases *EcoRI* and *HindIII* cleaving the plasmid in the corresponding restriction sites. After restriction two fragments of expected length of 2814 and 901 bp were observed in agarose gel (Fig. 4).

CONCLUSION

The analyses conducted allowed to confirm the presence and correctness of recombinant pTZ57R/T-VD plasmid insertion in *E. coli* DH10B cells. The work resulted in the recombinant *E. coli* cells carrying 826 bp fragment of E^{ms} gene.

The authors express their deep gratitude to the Professor Stefan Vilcek (University of Veterinary Medicine in Kosice, Republic of Slovakia) for the kindly provided samples of genotype 1b BVDV-1 (Ossloss strain) and BVDV-2 (Kosice strain) viral diarrhea virus.

The work was supported by Swiss National Science Foundation, Project SCOPES NF number IZ730Z0_128050: «Epidemiology of BVD in Ukraine: Development of a control program» from 2011 to 2012.

REFERENCES

1. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses / M. Baxi, D. McRae, S. Baxi [et al.] // Vet. Microbiol. – 2006. – Vol. 116. – P. 37–44.
2. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus / H.-J. Thiel, R. Stark, E. Weiland [et al.] // J. Virol. – 1991. – Vol. 65. – P. 4705–4712.
3. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus (BVDV) strains associated with severe outbreaks and

Fig. 3. Electrophoregram with amplification results using P1/P2 and M13/pUC_F/R primers in agarose gel
1–4, 10–13 – recombinant colonies carrying BVDV-I E^{ms} gene insertion;
5–8, 14–17 – recombinant colonies carrying BVDV-II E^{ms} gene insertion;
9, 18 – negative control;
M – molecular weight marker (100 bp DNA Ladder, OOO «Laboratoriya Izogen», Russia).

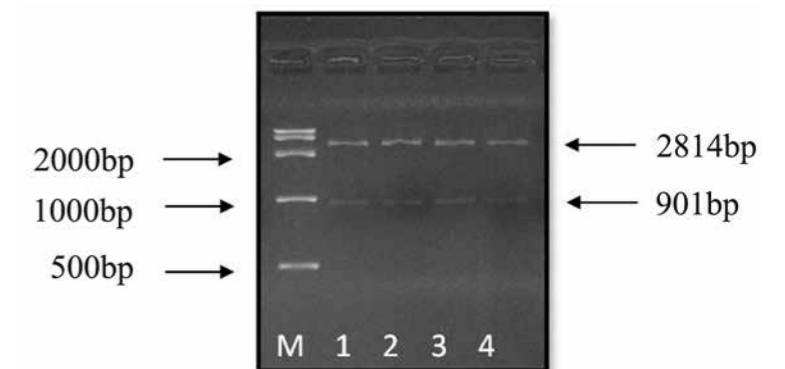


Fig. 4. Electrophoregram of pTZ57R/T-VD plasmid restriction analysis
1–2 – recombinant colonies carrying BVDV-I E^{ms} gene insertion;
3–4 – recombinant colonies carrying BVDV-II E^{ms} gene insertion;
M – molecular weight marker (Fast Ruler High Range DNA Ladder, Fermentas, Lithuania).

high mortalities / C. Pellerin, J. van den Hurk, J. Lecomte, P. Tjissen // Virology. – 1994. – Vol. 203. – P. 260–268.

4. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids / R. Boom, C. Sol, M. Salimans [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28, № 3. – P. 495–503.

5. Rice C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication // Fields Virol. – 3rd ed. – Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996. – P. 931–959.

6. Ridpat J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes // J. Virol. – 1994. – Vol. 205. – P. 66–74.

7. Sullivan D.G., Akkina R.K.A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses // Virus Res. – 1995. – Vol. 38. – P. 231–239.

ПУТИ ОЗДОРОВЛЕНИЯ ХОЗЯЙСТВ ОТ БОЛЕЗНЕЙ ПАЛЬЦЕВ, КОПЫТЕЦ И НЕКРОБАКТЕРИОЗА

Д.А. Хузин¹, Х.Н. Макаев², К.Х. Папуниди³, Т.Р. Гайнутдинов⁴, Н.А. Мухамметшин⁵, Р.Д. Хузин⁶

¹заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, доцент, ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», г. Казань, e-mail: vnivi@mail.ru

²заведующий отделом, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», г. Казань

³заместитель директора, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», г. Казань

⁴старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», г. Казань

⁵аспирант, ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», г. Казань

⁶аспирант, ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», г. Казань

РЕЗЮМЕ

Приведен эпизоотологический анализ распространения болезней пальцев и копытец крупного рогатого скота в различных хозяйствах страны начиная с 1990 г. Чаще всего основным этиологическим агентом выступает *Fusobacterium necrophorum*. Разработана схема ликвидации этих болезней, которая в производственных условиях показала хорошие результаты.

Ключевые слова: болезни пальцев и копытец, некробактериоз, комплекс мероприятий, вакцинация, специфическая провокация, схема поэтапного оздоровления.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы получили широкое распространение болезни пальцев и копытец крупного рогатого скота (БПК КРС), клинически проявляющиеся хромотой. По этиологии хромоты можно разделить на заразную и незаразную. В связи с этим предлагаются различные методы оздоровления хозяйств: расчистка, обрезка копытец, организация сбалансированного кормления и улучшения условий содержания, хирургическое лечение, групповые ножные ванны и дезматы, симптоматическая терапия, специфическая профилактика (вакцины и сыворотки).

Некробактериоз – инфекционная болезнь, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями всех органов и тканей организма, которые чаще всего проявляются на нижних частях конечностей, а также возможен распад тканей в ротовой полости, печени, легких, половых органах, вымени, хвосте и других тканях организма.

Патогенез некробактериоза изучен недостаточно, поэтому некоторые его аспекты носят предположительный характер. Известно, что во время вспышки некробактериоза происходит взаимодействие возбудителя с макроорганизмами, имеющими низкую резистентность, которых в популяции оказывается большинство. Заражение в основном происходит через мельчайшие повреждения поверхностного эпителия кожи и слизистых оболочек, возбудитель проникает в глубину тканей, размножается и разносится с кровью по всему организму, закупоривая мелкие кровеносные сосуды, что приводит к развитию очагов некроза. Из-за особенностей анатомо-топографического строения

конечностей крупного рогатого скота ворота и очаг инфекции чаще всего возникают в области нижней части конечностей, но возможно образование абсцессов в печени и легких и без поражения конечностей.

Основным резервуаром инфекции являются больные животные и бактерионосители, постоянно выделяющие патогенные штаммы возбудителя в окружающую среду. В связи с этим заболевают не отдельные животные, а большая их группа, и создается стационарный эпизоотический очаг, напряженность которого постоянно возрастает.

Имеются две противоположные точки зрения о вопросе иммунитета и специфической профилактики КРС при некробактериозе [1–3]. Наш многолетний практический опыт свидетельствует о ее необходимости и целесообразности.

Целью исследований была разработка мер оздоровления неблагополучных хозяйств от БПК и некробактериоза, организация лечебных и профилактических мероприятий среди КРС с использованием имеющегося арсенала средств, включая групповой и индивидуальный методы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ» изучение эпизоотологии, исследования по разработке средств профилактики и лечения БПК и некробактериоза проводятся с 1990 г. Для анализа распространения БПК и некробактериоза используются данные ветеринарных служб республик, областей, ветспециалистов районов и хозяйств, а также выездов сотрудников в неблагополучные хозяйства. В зависимости от условий хозяйствования, содержания животных (привязное, беспривязное, выгульное, безвыгульное, круглогодично-стойловое, летне-лагерное, поточно-цеховое и др.), кормовой базы и организации доения (в бидоны, молокопровод, доильный зал и др.) применяются различные подходы к оздоровлению хозяйств от БПК и некробактериоза. В каждом случае рекомендуется проводить комплекс мероприятий. Прежде всего это диспансеризация, четкий учет всех больных животных, лечебные мероприятия и обучение ветспециалистов современным методам расчистки, обрезки копытец, хирургической обработки пораженных копытец и корректному использованию дезинфектантов и лечебных препаратов (антибиотиков). По возможности все больные животные изолируются либо их формируют в отдельную группу и ставят на конец

транспортной линии. В обязательном порядке используется станок для фиксации животных (переносной и/или стационарный). Всех условно здоровых животных прогоняют через ножные ванны с профилактической и лечебной целью и проводят превентивную терапию с помощью препарата фузобаксан (ФБС).

В зависимости от тяжести инфекционного процесса и места локализации индивидуальное лечение начинают с жесткой фиксации животного, механической очистки и обмывания от загрязнений пораженных участков. Для бактериологических исследований с постановкой биопробы в транспортную среду отбирают на границе пораженной и здоровой тканей витальные соскобы. Нижнюю часть конечности отмывают от грязи с мылом и 0,1–0,5 % раствором перманганата калия. Обезболивая, удаляют хирургическим способом некротизированные тканевые дефекты (омертвевшую ткань, гной, затеки, ниши и карманы), обрабатывают рану 3 % раствором перекиси водорода и обсушивают марлевым тампоном. После этого на рану наносят антисептический порошок фузосана (ФЗС), обладающий сильным сорбирующим и регенерирующим свойствами. Препарат фиксируют марлевой повязкой, которую сверху смазывают вазелином, или накладывают гипсовую повязку. Последующую перевязку марлевой повязки проводят через 3 дня, гипсовую повязку снимают на 7 день. При необходимости дальнейшего лечения продолжают препаратами на мазевой и гелевой основе.

При установлении некробактериоза в обязательном порядке проводят специфическую профилактику всего поголовья формол-эмульсионной вакциной (ФЭВ). В начале наших исследований в качестве протективного антигена использовали белковые комплексы свежевыделенных местных изолятов возбудителя некробактериоза. Начиная с 2005 г. в состав вакцины включили антигены генетически маркированных штаммов «8» и «12».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За 22 года исследований отмечается стабильный рост заболеваемости БПК КРС и некробактериозом, который, несмотря на широкий арсенал лечебно-профилактических препаратов, продолжается до настоящего времени как в нашей стране, так и за рубежом. В большинстве обследованных хозяйств наибольший процент (от 25,6 до 41,3 %) патологии конечностей наблюдается среди дойного стада и нетелей, 98,6 % всех поражений приходится на задние конечности. БПК встречается повсеместно. Проблема остается нерешенной, поэтому имеются широкие возможности изыскательской работы по разработке и усовершенствованию методов оздоровления неблагополучных хозяйств на большом количестве животных.

Экономический ущерб от БПК связан со значительным снижением продуктивности и вынужденным убоем высокопродуктивных животных. Удой молока снижается от 25,3 до 57,3 %, вынужденный убой достигает 60 %. В начале исследований БПК имели выраженную сезонность (отмечался спад заболеваемости в пастбищный период). В настоящее время животные болеют в течение всего года, т.к. большинство хозяйств практикуют круглогодичное безвыгульное содержание и доение коров в основных помещениях, которые «не отдыхают».

При БПК выделяют разные виды микроорганизмов, состав которых в каждом хозяйстве может значительно отличаться. В основном обнаруживают: клостридии, стафилококки, дипло- и стрептококки, протей, кишечную палочку. По нашим данным, среди болезней пальцев и копытец наибольший ущерб наносит некробак-

териоз, поэтому, прежде чем приступить к проведению лечебно-профилактических мероприятий, необходимо исключить или подтвердить некробактериоз лабораторными методами исследования. От этого зависят все последующие мероприятия. В патологическом материале, поступающем с подозрением (по клинической картине) на некробактериоз, за весь период работы возбудитель обнаруживали в 59,6 % случаев. Для изоляции чистой культуры возбудителя некробактериоза доставку патологического материала целесообразнее осуществлять в холодное время года, т.к. он лучше сохраняется, а микробный пейзаж ферм менее разнообразен.

Для систематизации и правильной организации лечебно-профилактических мероприятий все БПК условно подразделяют по этиологическому принципу (вызывающим факторам) на три основные группы: 1 – травматические, 2 – вызванные нарушениями кормления, содержания и эксплуатации и 3 – инфекционные (некробактериоз). 1 группу профилактируют достаточно просто, устраняя факторы, вызывающие травмы. 2 группа носит более сложный системный характер, требует длительного времени и приложения больших усилий. Устранить ее можно только совместными усилиями всех специалистов сельхозпредприятия, т.к. они связаны с вопросами организации кормления, эксплуатации и содержания животных, являющимися общехозяйственными. 3 группа тесно связана с первыми двумя и значительно осложняет их течение. Некробактериоз возникает и распространяется как путем заноса возбудителя (при завозе скота) извне, так и по типу аутоинфекции, вследствие длительного воздействия первых двух этиологических факторов. В результате многолетних исследований нами разработаны оптимальные лечебно-профилактические мероприятия при некробактериозе, общие принципы которых отражены на рисунке.

Согласно этой схеме при помощи современных методик определяются причины, вызывающие заболевание конечностей в конкретном хозяйстве, и составляются рекомендации по улучшению общей эпизоотической ситуации.

Некробактериоз протекает в трех стадиях.

1. В начальной стадии развития болезни в зоне повреждения кожного покрова и внедрения *F. necrophorum* возникает воспалительная реакция, но она редко бывает достаточной для локализации и подавления микробного фактора. Первыми клиническими признаками некробактериозного процесса являются покраснение кожи и умеренный болезненный отек в зоне внедрения микробов, развивается горячий флегмонозный отек подкожной клетчатки и начинает формироваться клеточный барьер. В таких случаях лечение ограничивают курсовым внутримышечным введением препарата ФБС в дозе 0,2 мл на 10 кг массы тела.

2. Вторая, средняя (везикулезная), стадия характеризуется появлением в области венчика небольших пузырьков, заполненных липким мутновато-грязным экссудатом неприятного запаха, шерсть становится влажной, усиливается болевая реакция и отмечается сильная хромота. В области поражения развивается влажно-гангренозный процесс с образованием язвы. Общая температура повышается до 40 °С, и у отдельных животных возникают признаки пневмонии. Для лечения животного на этой стадии болезни применяют хирургическую обработку пораженных участков с полным удалением некротизированных тканей, санацией раны и нанесением препарата ФЗС под марлевой или гипсовой повязкой в сочетании с сочетанным использованием ФБС в указанных выше дозах до излечения.

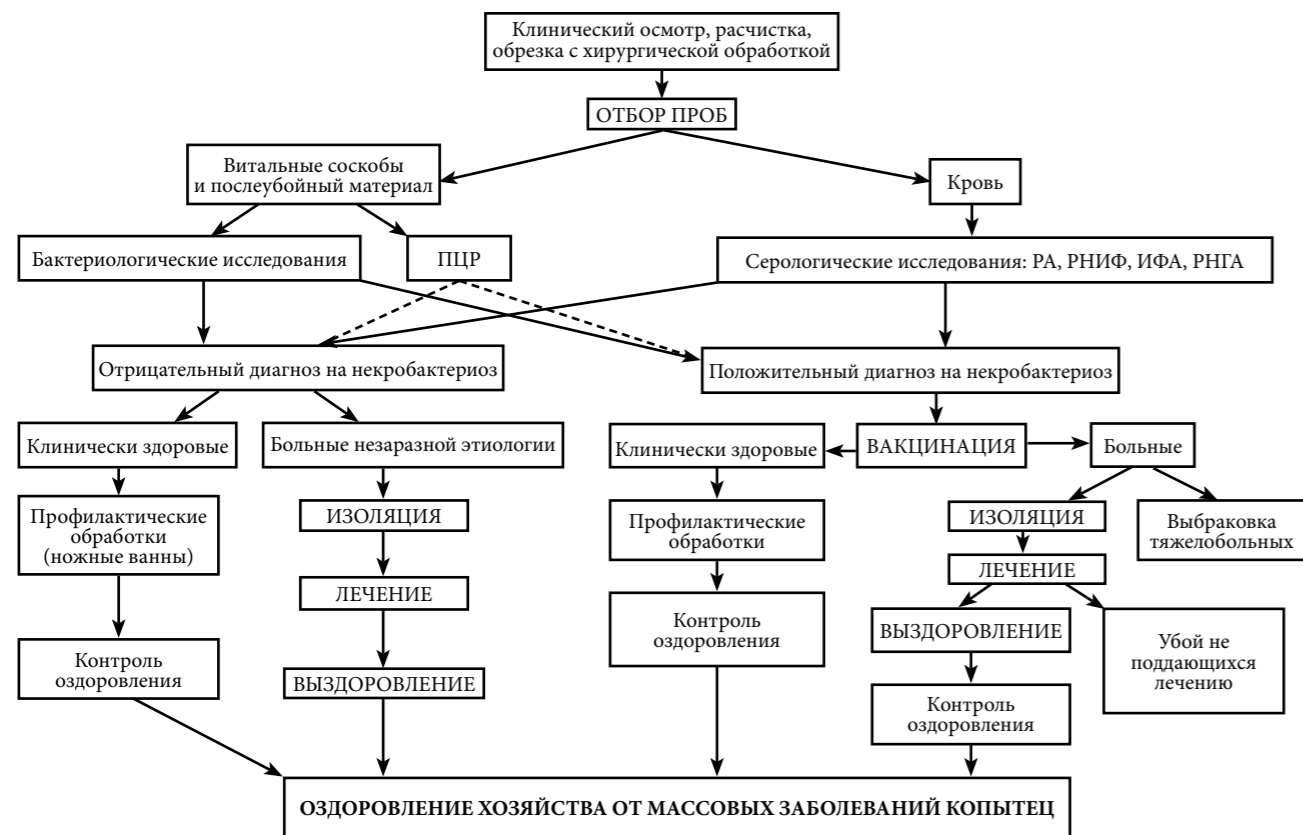


Рис. Лечебно-профилактические мероприятия против БПК и некробактериоза КРС

3. Третья, тяжелая (гангренозно-язвенная), стадия проявляется влажно-гангренозным процессом в мягких тканях. Вначале в этот процесс вовлекается венчик, мякиш, затем основа кожи копытец, путовая (пястная) область, что приводит к спадению копыта, некрозу связок и сухожилий, в результате чего на 4–5 день пораженная часть пальца, чаще в области венечно-копытцевого сустава, секвестрируется. На этой стадии прогноз становится сомнительным, поэтому лечение проводят как и при средней степени поражений, но только по целесообразности. Как правило, процент выздоровления на этой стадии низкий, поэтому рекомендуется строгая изоляция больных и последующая выбраковка не поддающихся лечению животных как мощных разносчиков инфекции.

После лечения все взрослое поголовье и молодняк с 6-месячного возраста иммунизируют ФЭВ согласно инструкции по применению. При выделении возбудителя некробактериоза мероприятия по оздоровлению хозяйств проводят согласно представленной схеме, больных лечат ФБС и ФЗС, а также применяют ножные ванны с лечебной и профилактической целью. Все поголовье подвергают вынужденной вакцинации ФЭВ против некробактериоза. Весьма эффективным бывает обливание задних конечностей растворами дезинфектантов, известкование мест прогона животных, организация сбалансированного кормления, профилактика травматизма и мацерации конечностей. В первые 2 недели после вакцинации у некоторых животных выявляется хромота, что свидетельствует о специфической провокации скрытого некробактериоза, подтверждающегося выделением культуры *F. necrophorum*. Таких животных успешно лечат 1–2-кратным введением терапевтических доз ФБС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ приведенных данных свидетельствует, что БПК КРС носят полиэтиологический характер. В основном БПК у крупного рогатого скота возникают из-за травм, стрессов, несбалансированного кормления, неправильной эксплуатации средств механизации. Как правило, животные инфицируются патогенной (некробактериоз, герпесвирус) и условно-патогенной микрофлорой. Чаще всего основным этиологическим агентом выступает *F. necrophorum*, поэтому для предотвращения угрозы инфицирования необходима специфическая профилактика.

В период проведения плановой вакцинопрофилактики некробактериоза с помощью ФЭВ отмечается стойкое благополучие хозяйств, и новых случаев возникновения БПК инфекционной этиологии не наблюдается. Однократная иммунизация позволяет профилировать некробактериоз в течение 5–6 месяцев. Вакцинация выявляет скрыто больных животных, что является важным преимуществом, которое позволяет активными лечебными мероприятиями поэтапно купировать хронические некробактериозные очаги.

Таким образом, для устойчивого благополучия хозяйств по БПК КРС и некробактериозу требуется системная продолжительная работа, которая должна включать общехозяйственные, санитарно-гигиенические и специальные ветеринарно-зоотехнические мероприятия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Опыт борьбы с некробактериозом животных / Ю.Д. Караваев, И.Н. Семенова, Н.В. Мельник [и др.] // Ветеринария. – 2003. – № 7. – С. 7–9.
2. Профилактика некробактериоза животных / О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, В.В. Меньшенин [и др.] // Ветеринария. – 1997. – № 5. – С. 15–17.
3. Самоловов А.А., Лопатин С.В. Некробактериоз крупного рогатого скота и пути решения проблемы // Аграрная Россия. – 2001. – № 3. – С. 34–38.

UDC 619:616.98:579.844.12:616.9-84

WAYS TO ERADICATE BOVINE HOOF DISEASES AND INTERDIGITAL NECROBACTERIOSIS ON FARMS

D.A. Khuzin¹, Kh.N. Makayev², K.Kh. Papunidi³, T.R. Gainutdinov⁴, N.A. Mukhammetshin⁵, R.D. Khuzin⁶

¹Head of Laboratory, Candidate of sciences (Veterinary Medicine), Associate Professor, FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety», Kazan, e-mail: vnivi@mail.ru

²Head of Unit, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety», Kazan

³Deputy Director, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), Professor, FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety», Kazan

⁴Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety» Kazan

⁵PhD student, FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety» Kazan

⁶PhD student, FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety» Kazan

SUMMARY

Epidemic analysis of bovine hoof disease spread on different domestic farms since 1990 is presented in the paper. The most frequent etiologic agent is *Fusobacterium necrophorum*. Eradication scheme for these diseases was developed which proved to be efficient under production conditions.

Key words: hoof diseases, interdigital necrobacillosis, set of measures, vaccination, specific induction, step-by-step eradication scheme.

INTRODUCTION

Bovine hoof diseases clinically manifested in lameness have widely spread over the recent years. Etiologically lameness may be divided into infectious and non-infectious. In this context different methods of eradication on farms may be proposed: hoof cleaning and trimming, balanced nutrition, housing improvement, surgical therapy, foot baths and disinfection mats, expectant treatment and specific prophylaxis (vaccines and sera).

Necrobacillosis is an infectious disease characterized by purulo-necrotic lesions of all body organs and tissues, most frequently manifested on lower extremities. Tissue destruction is also possible in mouth, liver, lungs, genitals, udder, tail and other body tissues.

Interdigital necrobacillosis (more common name is foot rot) pathogenesis is not studied thoroughly, that's why some aspects are of presumptive nature. It is known that during the outbreak the agent interacts with macroorganisms which have low resistance and present the major part of the population. The agent enters the body through smallest lesions on skin epithelium and mucous membrane, penetrates into the depth of tissues, propagates there and is distributed with blood all over the body blocking small blood vessels and resulting in necrosis

development. Due to peculiarities of bovine limb anatomy the gate and focus of the infection most frequently locate in lower limbs but abscesses may occur in liver and lungs without foot lesions.

Affected animals and bacillicarriers constantly shedding pathogenic strains into environment are the major reservoir of the infection. Due to this fact not individual animals but a large group of them are affected and a persistent outbreak develops the intensity of which constantly increases.

There are two opposite points of view regarding immunity and specific prophylaxis of cattle against foot rot [1–3]. Our many years' experience proves its necessity and reasonability.

The purpose of the study was to develop measures aimed at eradication of bovine hoof diseases and foot rot on affected farms, arrange therapeutic and preventive measures for cattle using the available tools and group and individual approaches.

MATERIALS AND METHODS

The FGBI «Federal Centre of Toxicological, Radiation and Biological Safety» has been dealing with epidemiology, development of prevention and therapy of bovine hoof diseases and foot rot since 1990. Data submitted by the veterinary services of republics, oblasts; veterinary specialists of rayons and farms as well as by experts visiting affected farms are used for bovine hoof diseases and foot rot spread analysis. Subject to management conditions and animal husbandry (tethered, non-tethered, free-ranged, in-door kept, all year round stabled, summer-grazed, segregated animals etc.), feeding and milking (into cans, milk line, milking room, etc.) different approaches of hoof disease and foot rot eradication are applied. Anyway it is recommended to take a set of measures. First of all animals should be examined; affected animals must be clearly accounted, therapeutic measures must be taken. Veterinarians should be trained in modern methods of hoof cleaning and trimming as well as in surgical treatment

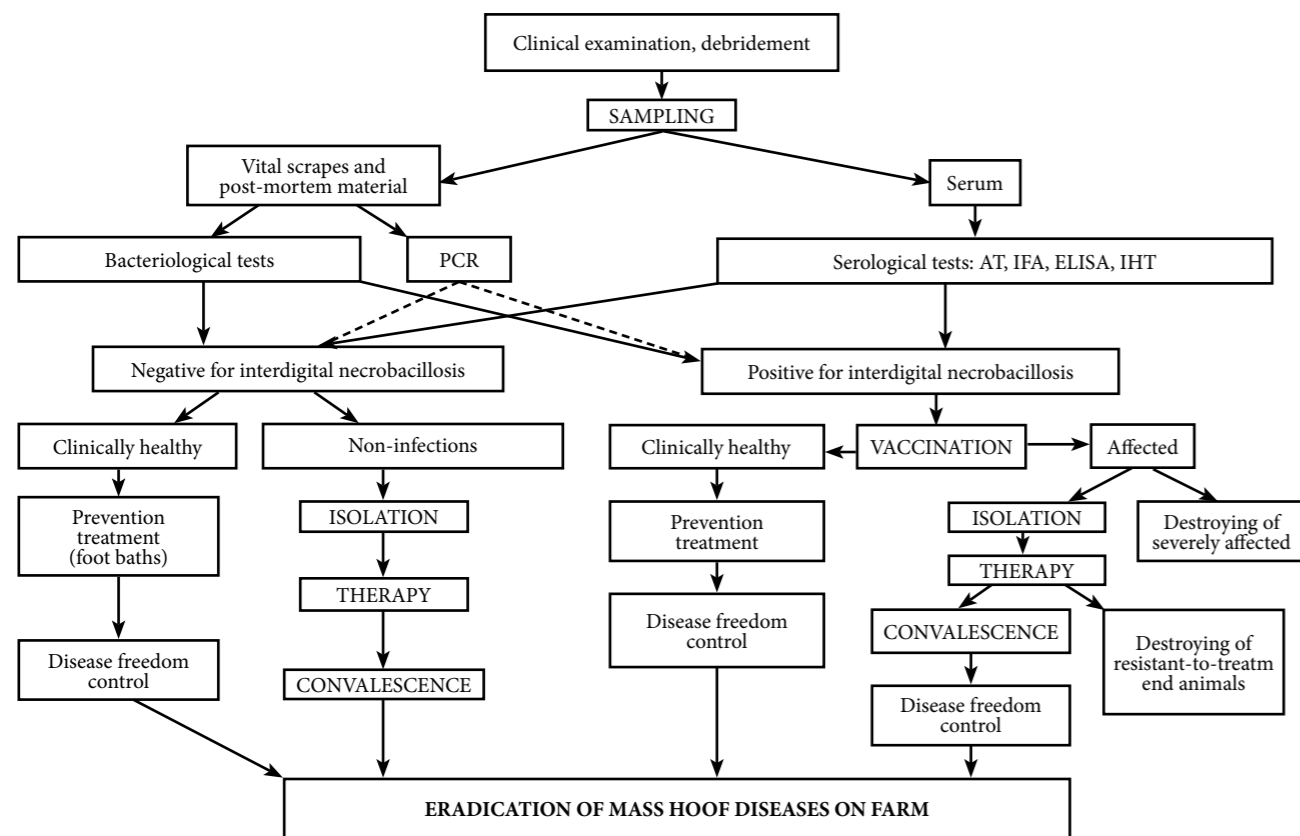


Fig. Therapeutic and preventive measures against bovine hoof diseases and foot rot

of affected hoofs and appropriate use of disinfectants and drugs (antibiotics). If it's possible all affected animals should be isolated or placed in a separate group at the end of conveyor line. Restraint equipment (mobile or fixed) must be used at all times. All apparently healthy animals are driven through foot baths for prevention and therapy purposes and subject to prevention treatment with Fuzobaksan.

Depending on the severity of infection and its location the treatment starts with rigid fixation of an animal, mechanical cleaning and washing of affected areas. For bacterial bioassays vital scrapes are collected into transportation medium in the site of affected and healthy tissue junction. The lower part of a limb is washed with soap and 0,1–0,5% potassium permanganate solution. Using anesthesia necrotizing tissue defects (dead tissue, purulence, leaks, holes and pockets) are removed surgically, lesion is treated with 3% hydrogen peroxide solution and dried with gauze plug. After that antiseptic powder Fuzosan with strong sorbing and regenerating properties is applied on the lesion. The preparation is fixed with gauze bandage which is vaselined afterwards and then the limb is plastered. The gauze bandage is changed in 3 days and plaster is removed on Day 7. If it's necessary the further treatment is continued with ointments and gels.

If foot rot is diagnosed specific prophylaxis is carried out for the whole population using formulated emulsion vaccine. At the beginning of our study protein complexes of freshly recovered foot rot agent local isolates were used as a protective antigen. Since 2005 antigens of genetically marked 8 and 12 strains have been included into the vaccine formulation.

RESULTS AND DISCUSSION

Stable increase in prevalence of bovine hoof diseases and foot rot has been noted during 22 years of studies in our country and abroad notwithstanding the availability of a wide range of therapeutic and preventive drugs. In the majority of surveyed farms a small percent (25,6–42,3%) of extremity pathology is observed in milking herds and heifers; 98,6% of all lesions are located on hind limbs. Bovine hoof diseases are common. The problem remains unsolved, that's why there are a lot of possibilities to carry out research in development and improvement of eradication techniques on affected farms using a large number of animals.

Economic losses caused by bovine hoof diseases are associated with a significant loss of productivity and emergency slaughter of high yielding animals. 25,3–57,3% milk yield decrease is registered; emergency slaughter reaches up to 60%. At the beginning of studies bovine hoof diseases were distinctly seasonal (morbidity decreased during grazing period). Currently animals get affected throughout the year because the majority of farms keep animals stabled all year round and milk them in the main rooms which are used without «resting» periods.

In the presence of bovine hoof diseases different microorganisms are isolated varying from farm to farm. In general clostridia, staphylococci, diplococci, streptococci, proteus, coliform bacteria are detected. Based on our data the greatest losses out of all bovine hoof diseases are caused by foot rot. That's why it is necessary to confirm the diagnosis by laboratory tests before starting taking therapeutic and prevention measures. All further measures depend on it. Foot rot agent was detected in 59.6% of all suspicious pathological material submitted during the whole study period. To isolate the pure culture of foot rot agent it is more reasonable to transport pathological

material in cold season, because it is better preserved and range of microbes on farms is less variable.

To systemize and arrange appropriately therapeutic and preventive measures all bovine hoof diseases are subdivided into three main groups based on the etiological principle (causative factors): 1 – traumatic; 2 – caused by violations of feeding, husbandry and management; 3 – infectious (interdigital necrobacillosis). The prevention in Group 1 is rather easy: trauma-provoking factors should be removed. Group 2 is associated with more complicated and systemic problems, removal of which needs longer time and greater efforts. This problem may be solved only by joint efforts of all farm animal handlers as they are connected with animal feeding, management and housing. Group 3 is closely connected with the abovementioned two groups and seriously complicates their courses. Foot rot occurs and spreads both ways: by the introduction of the agent from outside (when cattle is delivered) and by the way of autoinfection resulting from a long-term exposure to the first two etiological factors. After many years' research we have developed optimum therapeutic and preventive measures against interdigital necrobacillosis; their main principles are shown in Figure.

According to this scheme the causes of limb diseases on a particular farm are determined using modern techniques, and recommendations on epidemic situation improvement are made.

Foot rot has three stages.

1. At the initial stage inflammation occurs at the site of skin damage and *F. necrophorum* penetration, but the inflammation is usually not sufficient to localize and suppress the infection. The first clinical signs of foot rot are skin redness and mild painful edema at the site of microbial penetration, then «hot» phlegmonous edema of hypoderm develops and cell barrier starts growing. In such cases the treatment is limited to Fuzobaksan injection at the dose of 0,2 ml per 10 kg of body weight.

2. The second stage (vesicular) is characterized by the occurrence of small vesicles on the coronary band filled with sticky turbid exudate with foul odor, the hide gets wet, painful reaction grows and severe lameness is observed. Humid gangrenous process with ulcer formation develops at the affected site. Body temperature rises to 40°C and individual animals demonstrate pneumonia signs. To treat an animal at this stage local debridement of affected sites is used; necrotic tissues are completely removed, the lesion is disinfected using Fuzosan, gauze or plaster bandages in combination with Fuzobaksan at the abovementioned doses till complete recovery.

3. The third severe stage (gangrenous-ulcerous) is manifested with humid gangrenous process in soft tissues. At the beginning this process involves coronet, digital torus, then sole, pastern area and results in hoof falling off, ligament and tendon necrosis. On Day 4–5 the sequestration of the affected part of the limb, usually in the site of coffin joint, is observed. At this stage the forecast is doubtful that's why, if it is reasonable, the therapy is

performed as it was described for the second stage. As a rule the convalescence ratio is low that's why strict isolation of affected animals and further destroying of resistant to treatment animals as they are powerful infection vectors, is recommended.

After treatment all adult population and young animals older than 6 months of age are immunized with formulated emulsion vaccine in accordance with leaflet. In case interdigital necrobacillosis agent is isolated eradication measures on farm are taken according to the scheme above; the affected animals are treated with Fuzobaksan and Fuzosan, footbaths are used for therapeutic and preventive purposes. The whole population is subject to emergency vaccination with formulated emulsion vaccine against interdigital necrobacillosis. Washing of hind limbs with disinfectants, liming of pass ways, balanced feeding, limb injury and maceration prevention are rather efficient. During the first two weeks post vaccination some animals demonstrate lameness and that is indicative of specific induction of latent necrobacillosis which may be confirmed by *F. necrophorum* culture isolation. Such animals are successfully cured with 1–2 injections of Fuzobaksan at the therapeutic dose.

CONCLUSION

The analysis of given data is indicative of the fact that bovine hoof diseases are of poli-etiological nature. In general cattle are affected by hoof diseases due to injuries, stresses, unbalanced feeding, and incorrect maintenance of mechanical equipment. As a rule animals get infected by pathogenic (necrobacillosis, herpesvirus) and opportunistic pathogenic microflora. The most frequent etiologic agent is *F. necrophorum*, that's why specific prophylaxis is necessary for infection prevention.

During the period of scheduled preventive vaccination against foot rot using formulated emulsion vaccine lasting freedom from infection is observed and no new hoof disease cases are registered. A single vaccination enables to prevent foot rot for 5 – 6 months. Vaccination reveals latently affected animals which is an important benefit that enables to eradicate chronic necrobacillosis outbreaks step-by-step using active therapeutic measures.

Thus systemic long term activities involving general, hygienic and specific veterinary measures are needed to achieve stable favorable situation regarding bovine hoof diseases on farm.

REFERENCES

1. Experience in animal necrobacillosis control / Yu.D. Karavayev, I.N. Semyonova, N.V. Melnik [et al.] // Veterinariya. – 2003. – № 7. – P. 7–9.
2. Prevention of animal necrobacillosis / O.I. Solomakha, L.V. Kirillov, V.V. Menshenin [et al.] // Veterinariya. – 1997. – № 5. – P. 15–17.
3. Samolvov A.A., Lopatin S.V. Bovine foot rot and ways to solve the problem // Agrarnaya Rossiya. – 2001. – № 3. – P. 34–38.

ГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОДХОД К НАУЧНО ОБОСНОВАННОЙ СХЕМЕ ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В.Б. Тен¹, С.Г. Канатбаев², Е.К. Туяшев³, Б.М. Мустафин⁴, Ж.К. Тоганаев⁵

¹ доктор ветеринарных наук, профессор, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан, e-mail: Uralskaya.nivs@mail.ru

² доктор биологических наук, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

³ директор, кандидат ветеринарных наук, доцент, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

⁴ доктор ветеринарных наук, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

⁵ кандидат ветеринарных наук, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения эффективности инактивированной вакцины против бруцеллеза животных. Экспериментальные и производственные испытания проводились на большом количестве животных. Установлено, что поствакцинальные титры у привитых инактивированной вакциной животных на 90–120 сут. не обнаруживались. Данная вакцина оказалась безвредной и ареактивной. Однократное применение инактивированной вакцины производства ТОО «КазНИВИ» в комплексе с противозооотическими мероприятиями обеспечивает благополучие стада.

Ключевые слова: бруцеллез крупного рогатого скота, инактивированная вакцина, иммуногенность, заболеваемость, оздоровление, профилактика.

ВВЕДЕНИЕ

Состояние поствакцинального иммунитета при бруцеллезе при использовании инактивированных вакцин изучалось давно. Одни исследователи, применяя вакцины из инактивированных бруцелл для иммунизации мелкого рогатого скота, получили вполне удовлетворительные результаты. По их данным, такие вакцины не только предохраняют животных от абортос, но и в 67–80 % случаев предотвращают заболевание. После введения инактивированных вакцин образуются специфические антитела, повышается фагоцитарная активность нейтрофилов и наступает сенсбилизация организма.

В то же время данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что инактивированные вакцины пока не нашли широкого практического применения, так как если некоторые из них и создавали иммунитет, то он отличался кратковременностью и слабой напряженностью. Весьма низкая эффективность инактивированных вакцин объясняется тем, что антигены из убитых бруцелл не вызывают надлежащей иммунологической перестройки организма животных.

В настоящее время наибольшую популярность в мире приобрели инактивированные вакцины из штаммов *Br. abortus* 45/20 и *Br. melitensis* 53Н38, заключенные в водно-масляные адьюванты. При этом

наиболее изучены вакцины «Diphavak» (Голландия) и «Abortox» (Франция). При сравнении этих вакцин на морских свинках и нетелях было установлено, что оба препарата обеспечивали высокий уровень защиты (70–75 %).

Другим препаратом, который до сих пор находится в поле зрения исследователей, является адьювант-вакцина из штамма *Br. melitensis* 53Н38. Этот штамм был выделен в Мексике от человека. Он обладает высокой вирулентностью и используется для экспериментального заражения мелкого рогатого скота.

С успехом использовали вакцину из неагглютиногенного штамма *Br. abortus* 17/100 в Саратовской области, где неблагополучные хозяйства были оздоровлены в течение 6–15 месяцев [1].

Шумилов К.В. и Ишхалеев Ю.Н. [4] изучили реактогенные, антигенные и иммуногенные свойства вакцин из штаммов 45/20 и 53Н38 в сравнении с другими вакцинами в экспериментальных условиях Киргизии на овцах и баранах-производителях с заражением животных вирулентными культурами *Br. melitensis* 53Н38 и *Br. ovis*. Установили, что данные адьювант-вакцины производства фирмы «RHONE MERIEUX» обладают для овец высокими реактогенными свойствами, выражающимися повышением температуры тела на 1,2–2,0 °С, сильной местной реакцией в виде припухлости на месте подкожного введения препарата, которые сохраняются до 180 сут. В первые 15 сут. у 20 % подопытных животных наблюдали хромоту и у 100 % – угнетенное состояние и потерю аппетита.

С помощью бруцеллезной искусственной вакцины удалось оздоровить 35 эпизоотических очагов Волгоградской области, при этом препарат признан иммуногенным, безвредным и неабортотенным [2].

В Казахстане разработана инактивированная вакцина против бруцеллеза животных из R-штамма, которая, по мнению авторов, обеспечивает оздоровление хозяйств от бруцеллезной инфекции за короткие сроки и безопасна для окружающей среды [3].

Иммунизация скота противобруцеллезными вакцинами очень важна для Казахстана, где почти третья часть говядины производится за счет животных мясных пород. Только в Западно-Казахстанской области

две трети хозяйств специализированы на разведении мясного скота казахской белоголовой породы. Маточное поголовье этой породы большую часть года находится на пастбище, где для водопоя используют естественные водоемы. Поэтому трудно избежать контакта здорового скота с животными неблагополучных по бруцеллезу стад. Иммунизация таких гуртов будет способствовать предохранению животных от инфекции.

Целью работы было изучение в экспериментальных и производственных условиях иммуногенности инактивированной вакцины производства ТОО «КазНИВИ».

Для решения этой цели были поставлены следующие задачи:

– изучить динамику иммунологических реакций и напряженность иммунитета у молодняка КРС после иммунизации их инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ» и живой вакциной из штамма *Br. abortus* 82;

– испытать противозооотическую эффективность иммунизации животных инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ» при оздоровлении неблагополучных по этой инфекции хозяйств мясного направления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были созданы 3 группы морских свинок по 15 гол. в каждой. Животным 1 группы ввели инактивированную вакцину против бруцеллеза животных в объеме 1 см³ подкожно в области брюшка в дозе 5 млрд микробных клеток. 2 группу иммунизировали живой вакциной из штамма *Br. abortus* 82 подкожно в области брюшка в дозе 1 млрд микробных клеток; 3 группа служила контролем (не вакцинирована).

Через 2 мес. животные всех групп были заражены 5-кратной инфицирующей дозой вирулентной культуры *Br. abortus* 54. Через 30 сут. после заражения всех выживших морских свинок убили и провели бактериологическое исследование органов на бруцеллез.

С целью изучения наличия и динамики иммунологической реакции при иммунизации инактивированной вакциной были подобраны 3 группы крупного рогатого скота. Животным 1 группы (45 гол.) ввели инактивированную вакцину против бруцеллеза животных в объеме 5 см³ подкожно в дозе 500 млрд микробных клеток. 2 группу (45 гол.) иммунизировали живой вакциной из штамма *Br. abortus* 82 подкожно в дозе 100 млрд микробных клеток; 3 группа (40 гол.) служила контролем (не вакцинирована).

Диагностические исследования проводили с помощью реакции агглютинации (РА), реакции связывания комплемента (РСК) и Роз-Бенгал пробы (РБП) через каждые 30 сут. после вакцинации животных.

Было отобрано по 5 гол. животных от каждой группы, которых проверяли на напряженность иммунитета к бруцеллезу через 7 мес. после иммунизации путем подкожного (в среднюю треть шеи) заражения 5-крат-

ной инфицирующей дозой вирулентной культуры *Br. abortus* 54. Животных убили через 30 сут. после заражения и провели бактериологическое исследование органов на бруцеллез. Идентификацию и дифференциацию выделенных культур проводили согласно наставлениям по диагностике бруцеллеза.

Противозооотическую эффективность инактивированной вакцины ТОО «КазНИВИ» изучали в 2 крестьянских хозяйствах, которые занимаются разведением казахской белоголовой породы мясного направления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных табл. 1 видно, что по иммуногенности живая вакцина оказалась слабее инактивированной вакцины против бруцеллеза животных, и иммунитет составил 77,8 % против 83,3 %.

Серологические исследования материала от животных после вакцинации показали следующие результаты.

Животные 1 опытной группы отвечали на вакцинацию синтезом агглютинирующих антител, которые улавливались в РА на 7 сут. в титре 50 МЕ у 30 % животных, на 60 сут. наблюдалось максимальное количество реагирующих животных – 100 % в титре 160 МЕ, на 180 сут. агглютинины в сыворотке крови не обнаруживали.

Комплементсвязывающие антитела были выявлены на 7 сут. у 10 % особей в разведении 1:5, на 60 сут. – у 80 % в разведении 1:5, на 90 сут. – у 100 %, на 180 сут. антитела данной группы в сыворотке крови не обнаруживали.

В РБП на 7 сут. реагировало 50 %, а на 60 сут. – 100 % животных. Через 150 сут. после вакцинации все животные на РБП реагировали отрицательно.

Животные 2 группы (*Br. melitensis* Rev-1) отвечали на вакцинацию синтезом агглютинирующих антител, которые улавливались в РА на 7 сут. в титре 60 МЕ у 50 % животных, к 30 сут. наблюдалось максимальное количество реагирующих животных – 100 % в титре 106,3 МЕ, к 120 сут. агглютинины в сыворотке крови не обнаруживали.

Комплементсвязывающие антитела были выявлены на 7 сут. у 10 % особей в разведении 1:5, на 30 сут. – у 50 % в разведении 1:5, к 60 сут. – у 100 %, к 90 сут. комплементсвязывающие антитела в сыворотке крови не обнаруживали.

В РБП пробе на 7 сут. реагировало 70 % животных, на 30 сут. – 100 %. К 120 сут. после вакцинации все животные на РБП реагировали отрицательно.

В контрольной группе результаты серологических исследований во всех случаях были отрицательными.

Следовательно, специфические антитела в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных

Таблица 1. Состояние иммунитета к бруцеллезу у морских свинок после иммунизации инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ» и вакциной из штамма *Br. abortus* 82

№ группы	Количество		Выделено культур	Результаты бактериологического исследования	
	выживших животных	исследованных органов		количество заболевших	% иммунных
1	12	108	4	2	83,3
2	9	81	5	2	77,8
3	12	108	41	12	–

Таблица 2. Состояние иммунитета к бруцеллезу у животных после иммунизации инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ» и вакциной из шт. *Br. abortus* 82

№ группы	Количество		Выделено культур	Результаты бактериологического исследования	
	исследованных животных	исследованных органов		количество заболевших	% иммунных
1	5	50	2	1	80
2	5	50	3	1	80
3	5	50	17	10	–

инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ» и вакциной из штамма *Br. melitensis* Rev-1, не обнаруживали на 90–120 сут. и 150–180 сут. соответственно.

Как видно из табл. 2, напряженность иммунитета у животных 1 и 2 групп одинаковая.

Результаты исследований показывают, что животные 1 опытной группы отвечали на вакцинацию синтезом агглютинирующих антител, которые улавливались в РА на 7 сут. в титре 50 МЕ у 30 % животных, на 60 сут. наблюдалось максимальное количество реагирующих животных – 100 % в титре 160 МЕ, на 180 сут. агглютинины в сыворотке крови не обнаруживали.

Комплементсвязывающие антитела были выявлены на 7 сут. у 10 % особей в разведении 1:5, на 60 сут. – у 80 % в разведении 1:5, на 90 сут. – у 100 %, на 180 сут. антитела данной группы в сыворотке крови не обнаруживали.

В РБП на 7 сут. реагировало 50 % животных, на 60 сут. – 100 %. Через 150 сут. после вакцинации все животные в РБП реагировали отрицательно.

Животные 2 группы отвечали на вакцинацию синтезом агглютинирующих антител, которые улавливались в РА на 7 сут. в титре 60 МЕ у 50 % животных, к 30 сут. наблюдалось максимальное количество реагирующих животных – 100 % в титре 106,3 МЕ, к 120 сут. агглютинины в сыворотке крови не обнаруживали.

Комплементсвязывающие антитела были выявлены на 7 сут. у 10 % особей в разведении 1:5, на 30 сут. – у 50 % в разведении 1:5, к 60 сут. – у 100 %, к 90 сут. антитела данной группы в сыворотке крови не обнаруживали.

В РБП пробе на 7 сут. реагировало 70 % животных, на 30 сут. – 100 %, к 120 сут. после вакцинации все животные на РБП реагировали отрицательно.

В контрольной группе результаты серологических исследований во всех случаях были отрицательными.

Следовательно, в сыворотке крови всех животных, иммунизированных инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ», специфические антитела в виде агглютининов и комплементсвязывающих веществ не обнаруживали на 90–120 сут., а у животных, иммунизированных вакциной из штамма *Br. melitensis* Rev-1, специфические антитела не устанавливали на 150–180 сут.

В неблагополучном по бруцеллезу крупного рогатого скота к/х «Кабыршақты» весной 2012 г. отмечено 5 случаев аборт. При серологическом исследовании поголовья животных в апреле–июне 2012 г. положительно реагировало 95 гол., т.е. зараженность бруцеллезом составила 10 %. После удаления больных животных оставшиеся 943 гол. были привиты инактивированной вакциной (коровы – 631 гол., телки перед случкой – 197 гол., молодежь текущего года рожде-

ния – 115 гол.). При этом у стельных коров случаев абортов не отмечалось.

При серологических исследованиях в апреле–июне 2013 г. положительно реагировали на бруцеллез 58 гол. (6,1 %), т.е. заболеваемость в результате применения инактивированной вакцины снижена на 3,9 %.

До внедрения инактивированной вакцины против бруцеллеза животных в к/х «Аксуат», считающемся благополучным по бруцеллезу крупного рогатого скота, зараженность среди крупного рогатого скота составила 1,0 %, а среди овец – 0,1 %.

160 гол. крупного рогатого скота и 120 гол. овец этого хозяйства привиты инактивированной вакциной ТОО «КазНИВИ». Отелы и окоты у этих животных весной прошли нормально, результаты весенних серологических исследований на бруцеллез были отрицательными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инактивированная вакцина ТОО «КазНИВИ» против бруцеллеза животных является безвредной и иммуногенной. В сыворотке крови животных, иммунизированных этой вакциной, специфические антитела в виде агглютининов и комплементсвязывающих антител не обнаруживались на 90–120 сут. У телок, привитых инактивированной вакциной, устойчивость к бруцеллезу составила 70 %. Однократное применение инактивированной вакцины в комплексе с противозооотическими мероприятиями обеспечивает благополучие стада.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жованик П.Н. Бруцеллез / под общей ред. П.Н. Жованика. – Киев, 1975. – 222 с.
2. Изучение иммуногенных свойств бруцеллезной искусственной вакцины в эксперименте и производственных условиях / Л.А. Малышева, В.В. Сочнев, В.М. Авилов [и др.] // Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных: сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2000. – С. 255–257.
3. Перспективность применения инактивированных вакцин в практике / В.Б. Тен, Б.М. Мустафин, М.Б. Базарбаев, Ж.К. Тоганаев // Теоретические и практические аспекты развития современной ветеринарной науки: сб. науч. тр. ТОО «КазНИВИ». – Алматы, 2012. – Т. LVIII. – С. 259–266.
4. Шумилов К.В., Ишхалеев Ю.Н. Иммуногенные свойства инактивированных адъювант-вакцин из штаммов *Br. abortus* 45/20 и *Br. melitensis* 53H38 // Пути совершенствования профилактики и диагностики бруцеллеза сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр. ВАСХНИЛ, ВНИИБТЖ. – Омск, 1990. – С. 53–58.

UDC 610:616.98:579.841.93-076

GENERATIVE APPROACH TO SCIENTIFICALLY GROUNDED REGIMEN FOR BOVINE BRUCELLOSIS PREVENTION

V.B. Ten¹, S.G. Kanatbayev², E.K. Tuyashev³, B.M. Mustafin⁴, Zh.K. Toganayev⁵

¹Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, West-Kazakhstan Animal Health Research Station, TOO «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan, e-mail: Uralskaya.nivs@mail.ru

²Doctor of Science (Biology), Professor, West-Kazakhstan Animal Health Research Station, TOO «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

³Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), West-Kazakhstan Animal Health Research Station, TOO «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

⁴Doctor of Science (Veterinary Medicine), West-Kazakhstan Animal Health Research Station, TOO «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

⁵Candidate of Science (Veterinary Medicine), West-Kazakhstan Animal Health Research Station, TOO «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

SUMMARY

Data on examination of animal brucellosis inactivated vaccine efficacy are demonstrated. Both experimental and field tests were performed using a large number of animals. It was identified that in 90–120 dpi no postvaccinal titers were detected in animals immunized with inactivated vaccine. The vaccine was safe and non-reactive. Single vaccination with the TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine in combination with antiepidemic measures provides for the herd disease freedom.

Key words: bovine brucellosis, inactivated vaccine, immunogenicity, disease prevalence, eradication, prevention.

INTRODUCTION

Brucellosis postvaccinal immunity has been examined for a long time. Some researchers obtained quite satisfactory results using inactivated brucella-based vaccines for immunization of sheep and goats. According to their data such vaccines do not only protect animals from abortions but prevent the disease in 67–80% of cases. Following the inactivated vaccine administration specific antibodies are generated, phagocytic activity increases and body sensitization occurs.

Meanwhile data of multiple researches are indicative of the fact that inactivated vaccines have not been widely used yet as some of them induce short-term and weak immunity. Low efficacy of the inactivated vaccines can be explained by the fact that antigens of the killed brucella do not induce adequate immunological rearrangement in the animal body.

Currently, inactivated vaccines based on *Br. abortus* 45/20 and *Br. melitensis* 53H38 strains encapsulated in water and oil adjuvants are the most popular in the world. Herewith, the most investigated are «Duhavak» (Holland) and «Abortox» (France) vaccines. While comparing the vaccines in guinea pigs and heifers it was determined that both preparations induced high level of protection (70–75%).

Another preparation still examined by the researchers is an adjuvant vaccine based on *Br. melitensis* 53H38

strain. This strain was isolated from human in Mexico. It is highly virulent and used for experimental infection of sheep and goats.

Use of the vaccine based on non-agglutinogenic *Br. abortus* 17/100 strain in the Saratov Oblast was successful and the disease was eradicated in the affected farms within 6–15 months [1].

Shumilov K.V. and Ishkhalev Yu.N. [4] examined reactogenic, antigenic and immunogenic properties of the vaccines based on strain 45/20 and 53H38 as compared to other vaccines. The examinations were performed under experimental conditions of Kyrgyzstan in sheep and studrams infected with *Br. melitensis* 53H38 and *Br. ovis* virulent cultures. It was determined that such adjuvant vaccines manufactured by RHONE MERIEUX demonstrated high reactogenic properties for sheep manifested in 1,2–2,0°C pyrexia, acute local reaction in the form of swelling at the site of the vaccine subcutaneous administration. Such swellings persisted for up to 180 days. During the initial 15 days 20% of animals demonstrated lameness and 100% of animals were depressed and anorexic.

Using artificial brucellosis vaccine 35 epidemic outbreaks were eradicated in the Volgograd Oblast. Herewith the product was admitted as immunogenic, safe and non-abortogenic [2].

Inactivated brucellosis vaccine based on R-strain was developed in Kazakhstan. The authors consider this vaccine to facilitate rapid eradication of the brucellosis infection. It is also considered to be environment friendly [3].

Cattle immunization with brucellosis vaccines is of great significance for Kazakhstan, where almost one third of total beef production is due to beef animals. Just in West-Kazakhstan Region two-thirds of the farms are oriented at raising Kazakh Whiteheaded beef cattle. Parent stock of this breed is at year-round grazing and natural water reservoirs are used for animal watering. Thus it is hard to avoid contacts between healthy animals and animals from brucellosis affected herds. Immunization of such herds would provide for animal prevention from the infection.

Table 1. Brucellosis immunity level in guinea pigs following immunization with TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine and *Br. abortus* 82-based vaccine

Group No.	Number of		Cultures isolated	Bacteriological test results	
	survived animals	tested organs		number of diseased animals	% of immune animals
1	12	108	4	2	83,3
2	9	81	5	2	77,8
3	12	108	41	12	–

The work was aimed at examination of immunogenicity of TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine under experimental and field conditions.

The following goals were set for that purpose:

- examination of the immune response dynamics and immunity level in young cattle following their immunization with TOO KazNIVI-manufactured inactivated vaccine and with live vaccine based on *Br. abortus* 82 strain;
- testing of antiepidemic efficiency of animal immunization with TOO KazNIVI-manufactured inactivated vaccine aimed at disease eradication in meat-producing farm affected with the infection.

MATERIALS AND METHODS

Three groups of 15 guinea-pigs were formed. Animals in the first group were administered an inactivated brucellosis vaccine at the amount of 1 cm³. The vaccine was administered subcutaneously in the belly area at a dose of 5 billion of microbial cells. The animals of the second group were immunized with the live vaccine based on *Br. abortus* 82 strain. The vaccine was administered subcutaneously in the area of the belly at a dose of 1 billion of microbial cells. The animals of the third group were used as controls (non-vaccinated).

In 2 months animals of all groups were infected with a 5-fold infective dose of the virulent *Br. abortus* 54 culture. In 30 dpi all survived guinea-pigs were euthanized and their organs were bacteriologically tested for brucellosis.

To examine immunity response presence and dynamics following immunization with the inactivated vaccine 3 groups of cattle were formed. The animals of the first group (45 animals) were administered 5 cm³ of inactivated brucellosis vaccine. The vaccine was administered subcutaneously at a dose of 500 billion microbial cells. The animals of the second group (45 animals) were immunized with another live vaccine based on *Br. abortus* 82 strain at a dose of 1000 billion microbial cells. Animals of the third group (40 animals) were used as controls.

Diagnostic testing was performed using agglutination test (AT), complement fixation test (CFT) and rose-bengal test (RBT) each 30 days post animal vaccination.

5 animals were taken from each group and they were tested for brucellosis immunity level in 7 months post immunization. The testing was performed by subcutaneous challenge (middle part of the neck) with 5-fold infective dose of *Br. abortus* 54 virulent culture. The animals were euthanized in 30 dpi and their organs were bacteriologically tested for brucellosis. Identification and detection of isolated cultures were performed in accordance with the Guidelines for Brucellosis Diagnosis.

Antiepidemic efficiency of TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine was tested on 2 backyard farms raising Kazakh Whiteheaded beef cattle.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 demonstrates that as for immunogenicity the live vaccine was less active as compared to the inactivated vaccine and the immunity amounted to 77,8% as opposed to 83,3%.

Serological testing of materials obtained from animals following vaccination demonstrated the following results:

Animals of Group 1 responded to the vaccination with a synthesis of agglutinating antibodies demonstrated on day 7 in 30% of animals by AT at a titer of 50 IU. On day 60 the maximum number of reacting animals was 100% with a titer of 160 IU. On day 180 no agglutinins were detected.

Complement-fixing antibodies were demonstrated on day 7 by 10% of animals at 1:5 dilution; on day 60 – by 80% of animals at 1:5 dilution; on day 90 – by 100% of animals and on day 180 no such antibodies were detected in sera.

RBT results demonstrated 50% of reacting animals on day 7 and 100% of reacting animals on day 60. In 150 days post vaccination all animals were negative in RBT.

Animals from group 2 (*Br. melitensis* Rev-1) responded to vaccination with a synthesis of agglutinating antibodies, which were AT-demonstrated at a titer of 60 IU in 50% of animals on day 7, by day 30 the maximal number of reacting animals was 100% with a titer of 106.3 IU; by day 120 no agglutinins were detected in blood.

Complement-fixing antibodies were demonstrated by 10% of animals on day 7 at 1:5 dilution; on day 30 – by 50% of animals at 1:5 dilution; on day 60 – by 100% of animals and on day 90 no complement-fixing antibodies were detected in sera.

RBT results demonstrated 70% of reacting animals on day 7 and 100% of reacting animals on day 30. By day 120 post vaccination all animals were negative in RBT.

Animals of the control group demonstrated negative results in all serological tests.

Thus no specific antibodies were detected in sera of guinea-pigs immunized with TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine and *Br. melitensis* Rev-1-based vaccine on day 90–120 and 150–180, respectively.

Table 2 demonstrates that immunity levels in animals of both group 1 and group 2 are similar.

Test results are indicative of the fact that animals of experimental group 1 responded to vaccination with agglutinating antibody synthesis, which was demonstrated on day 7 in 30% of animals by AT at a titer of 50 IU; by day 60 the maximal number of reacting animals was 100% with a titer of 160 IU; by day 180 no agglutinins were detected in blood.

Complement-fixing antibodies were demonstrated by 10% of animals on day 7 at 1:5 dilution; on day 60 – by 80% of animals at 1:5 dilution; on day 90 – by 100% of animals and on day 180 no such antibodies were detected in sera.

RBT results demonstrated 50% of reacting animals on day 7 and 100% of reacting animals on day 60. In 120 days post vaccination all animals were negative in RBT.

Animals from group 2 responded to vaccination with a synthesis of agglutinating antibodies, which were AT-demonstrated on day 7 at a titer of 60 IU in 50% of animals, by day 30 the maximal number of reacting animals was 100% at a titer of 106.3 IU; by day 120 no agglutinins were detected in blood sera.

Complement-fixing antibodies were demonstrated by 10% of animals on day 7 at 1:5 dilution; on day 30 – by 50% of animals at 1:5 dilution; on day 60 – by 100% of animals and on day 90 no complement-fixing antibodies were detected in sera.

RBT results demonstrated 70% of reacting animals on day 7 and 100% of reacting animals on day 30. By day 120 post vaccination all animals were negative in RBT.

Animals of the control group demonstrated negative results in all serological tests.

Thus no specific antibodies such as agglutinins and complement-fixing antibodies were detected in sera of all animals vaccinated with TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine on day 90–120 post vaccination and no specific antibodies were identified in the animals immunized with *Br. melitensis* Rev-1-based vaccine on day 150–180.

Five abortions were reported in bovine brucellosis affected collective farm «Kabyrshakty» in spring, 2012.

Serological tests of the animal population in April–June, 2012 demonstrated 95 positively reacting animals, i.e. brucellosis infection amounted to 10%. As soon as the diseased animals were culled the remaining 943 animals were vaccinated with the inactivated vaccine (631 cows, 197 heifers, 115 young animals born in the current year). Herewith, no abortions were reported in pregnant cows.

Serological testing in April–June, 2013, demonstrated 58 animals positively reacting to brucellosis (6,1 %), so due to inactivated vaccine administration the disease prevalence decreased by 3,9%.

Before introduction of inactivated brucellosis vaccine in the collective farm «Aksuat», which now is considered free from bovine brucellosis, the infection amounted to 1,0% in cattle and 0,1% in sheep.

160 cattle and 120 sheep on the farm were vaccinated with TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine. In spring calving and lambing were normal and spring serological test results were negative.

CONCLUSION

TOO KazNIVI-manufactured vaccine against brucellosis is safe and immunogenic. No specific antibodies such as agglutinins and complement-fixing antibodies were detected in sera of animals immunized with the vaccine on day 90–120. Inactivated vaccine immunized heifers demonstrated 70%-protection against brucellosis. Single administration of the inactivated vaccine along with antiepidemic measures provide the disease freedom of the herd.

REFERENCES

1. Zhovanik P.N. Brucellosis / ed. Zhovanik P.N. – Kiev, 1975. – 222 p.
2. Examination of Immunogenic Properties of Artificial Brucellosis Vaccine under Experimental and Field Conditions / L.A. Malysheva, V.V. Sochnev, V.M. Avilov [et al.] // Current issues of animal brucellosis and tuberculosis: VNIIBTG Collection. – Omsk, 2000. – P. 255–257.
3. Practical Prospects of the Inactivated Vaccine Use / V.B. Ten, B.M. Mustafin, M.B. Bazarbayev, Zh. K. Toganayev // Theoretical and practical aspects of the current veterinary medicine development: in collection of TOO «KazNIVI». – Almaty, 2012. – Vol. LVIII. – P. 259–266.
4. Shumilov K.V., Ishkhaleyev Yu.N. Immunogenic Properties of Inactivated Adjuvant Vaccines Based on *Br. abortus* 45/20 and *Br. mellitensis* 53H38 Strains // Methods for farm animal brucellosis prevention and diagnosis: in collection: All-Union V.I. Lenin Academy of Agriculture, VNIIBTG. – Omsk, 1990. – P. 53–58.

Table 2. Brucellosis immunity level in animals immunized with TOO «KazNIVI»-manufactured inactivated vaccine and *Br. abortus* 82-based vaccine

Group No.	Number of		Cultures isolated	Bacteriological test results	
	survived animals	tested organs		number of diseased animals	survived animals
1	5	50	2	1	80
2	5	50	3	1	80
3	5	50	17	10	–

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А В ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ МЫШИНОЙ МИЕЛОМЫ SP2/0-AG.14

А.С. Банделюк¹, Е.С. Седова², И.Ю. Грибова³, И.Б. Есмагамбетов⁴, Б.В. Новиков⁵

¹младший научный сотрудник, ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва, e-mail: alinabond88@mail.ru

²научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

³младший научный сотрудник, ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

⁴младший научный сотрудник, ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

⁵ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

РЕЗЮМЕ

Была изучена мембранная экспрессия гена гемагглютинаина вируса гриппа А подтипов Н3 и Н5 в культуре клеток миеломы мыши SP2/0-Ag.14 генотипа Balb/c. В реакции непрямого иммуноферментного анализа экспрессия гена гемагглютинаина отмечалась через 16 ч после инфицирования. При постановке прижизненной иммунофлюоресценции максимальные значения мембранной экспрессии выявлены спустя 24–48 ч инкубации клеток с вирусом.

Ключевые слова: гемагглютинин, мембранная экспрессия, не прямой ИФА, иммунофлюоресценция.

ВВЕДЕНИЕ

Сложность изучения противоклеточного иммунного ответа при вирусных инфекциях заключается в необходимости соблюдения условий сингенности, поскольку цитотоксические Т-лимфоциты рестриктированы по главному комплексу гистосовместимости. При оценке протективных свойств новых кандидатных вакцин в качестве клеток-мишеней требуется использовать клеточную линию, несущую тот же генотип, что и используемые животные модели [1]. Поэтому явный интерес представляло изучение возможности использования линии клеток миеломы SP2/0-Ag.14, имеющих генотип Balb/c, инфицированных вирусом гриппа А, в качестве клеток-мишеней для оценки цитолитического потенциала иммунокомпетентных клеток у вакцинируемых мышей того же генотипа.

Целью настоящей работы являлась оценка экспрессии гена гемагглютинаина на мембране клеток миеломы SP2/0-Ag.14 генотипа Balb/c, инфицированных вирусом гриппа А.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе использовали два подтипа вируса гриппа: A/Aichi/2/68(H3N2) и A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84(H5N2). Культуру клеток миеломы SP2/0 инфицировали вирусом гриппа из расчета 1 бляшкообразующая единица (ББОЕ) на клетку. Зара-

женные клетки инкубировали при 37 °С, 5 % CO₂, после чего проводили оценку мембранной экспрессии гена гемагглютинаина при помощи непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) и прижизненной иммунофлюоресценции.

Клетки. В работе была использована культура клеток миеломы мыши SP2/0-Ag.14 генотипа Balb/c.

Антитела. Мышинные моноклональные антитела (мка) к гемагглютинуину вируса гриппа А H3N2 (Sino Biological Inc, 11056-MM03), мышинные мка к гемагглютинуину вируса гриппа А H5N1 (Sino Biological Inc, 11048-MM01), контрольные сыворотки неиммунных мышей, антимышинные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, A4416), поликлональные вторичные антитела против IgG мыши, меченые изотиоцианатом флюоресцеина (ФИТЦ) (Abscam, ab6785).

Непрямой ИФА. Для постановки непрямого ИФА [2] инфицированные клетки фиксировали 0,1 % глутаровым альдегидом (30 мин, t_{комн.}). Остаточные активные альдегидные группы блокировали глицином (30 мин, t_{комн.}). Для отмывки клеток использовали фосфатный буферный раствор (ФБР, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,2–7,4). Клетки инкубировали с первичными антителами против гемагглютининов вируса гриппа А Н3 и Н5 и с контрольными неиммунными сыворотками в течение 1 ч при 37 °С. Затем, после отмывки ФБР, клетки инкубировали со вторичными антимышинными антителами в течение 1 ч при 37 °С. После инкубации со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в реакционную смесь вносили раствор субстрата (тетраметилбензидин), инкубировали 15 мин в темном месте и останавливали реакцию 4M H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм. При использовании в качестве вторичных антител антимышинных IgG, меченых ФИТЦ, исследование флюоресценции проводили с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX71 при длине волны 400–250 нм.

Прижизненная иммунофлюоресценция. Оценка экспрессии гена гемагглютинаина вируса гриппа А в инфицированных клетках проводили через 16 ч после инфицирования с помощью прижизненной иммунофлюоресценции. Для постановки прижизненной

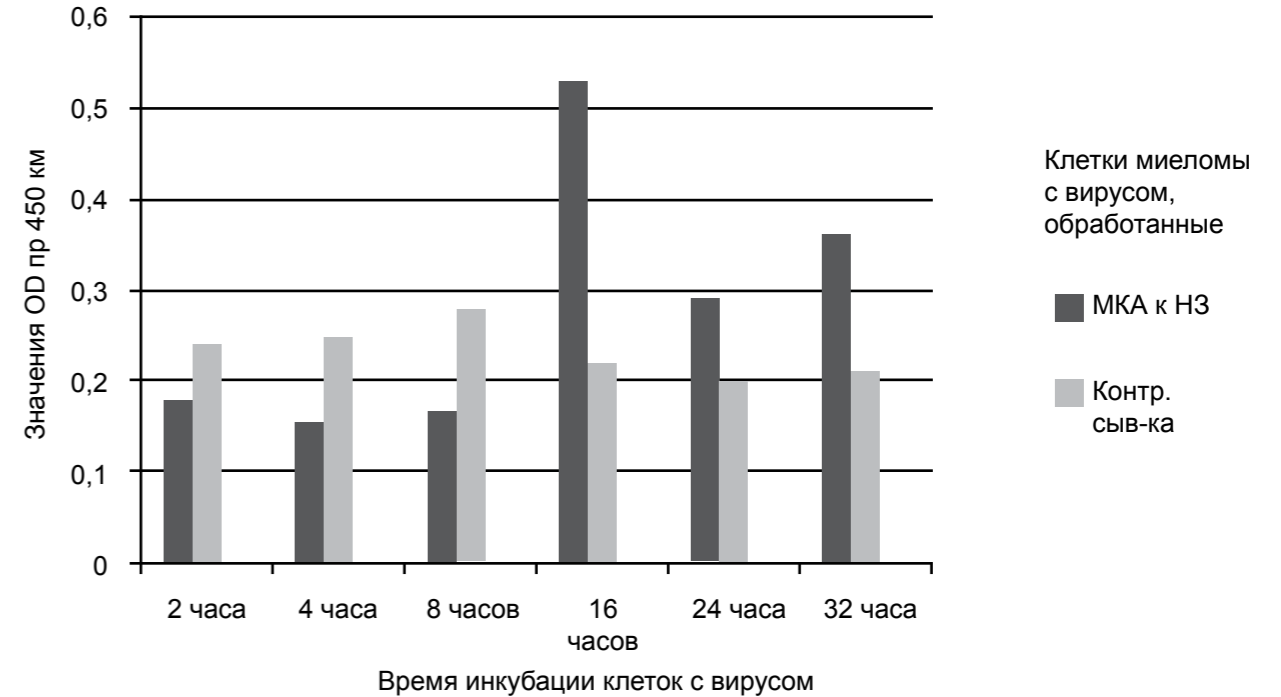


Рис. 1. Оценка экспрессии гена гемагглютинаина вируса гриппа А в клетках миеломы SP2/0-Ag.14

иммунофлюоресценции суспензию инфицированных клеток инкубировали с первичными антителами к гемагглютинуину вируса гриппа А 30 мин при 4 °С. Отмывку от несвязавшихся антител проводили физиологическим раствором с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Суспензию клеток центрифугировали при 1000 об/мин, 5 мин, 4 °С. Супернатант удаляли. Затем вносили вторичные антитела (антимышинные IgG, меченые ФИТЦ) и инкубировали 20 мин при 37 °С. После отмывки физиологическим раствором с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота оценивали флюоресценцию клеток с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX71 при длине волны 400–250 нм.

Оценка динамики экспрессии гена гемагглютинаина вируса гриппа А. Динамику экспрессии гена гемагглютинаина оценивали методом непрямого ИФА. Культуру клеток миеломы инфицировали вирусом гриппа А (H5N2 и H3N2) таким образом, чтобы к моменту постановки непрямого ИФА были получены временные точки: 16, 24, 48 и 72 ч после заражения. Клетки обрабатывали специфическими мка к Н5 и Н3 и вторичными антителами против IgG мыши, мечеными ФИТЦ. Проводили визуальный подсчет общего числа клеток в поле зрения микроскопа (×20 увеличение) и количества флюоресцентных клеток. Для каждой временной точки исследовали 4 поля зрения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессию гена гемагглютинаина в культуре инфицированных клеток оценивали методом непрямого ИФА спустя 2, 4, 8, 16, 24 и 32 ч после заражения с помощью мка к гемагглютинуину вируса гриппа А H3N2. На рис. 1 показаны значения оптической плотности (OD, optical density) в образцах инфицированных клеток миеломы, обработанных мка к Н3 и контрольной неиммунной сывороткой мыши. Видно, что значения OD в опытных образцах спустя 2, 4 и 8 ч после инфицирования (OD=0,16) не превышают значения OD с контрольной сывороткой (OD=0,25). Достоверная разница между опытными и контрольными образцами наступает спустя 16 ч после инфицирования (OD=0,53

с мка, OD=0,23 с контрольной сывороткой) и наблюдается до 32 ч после инфицирования.

Также для оценки мембранной экспрессии гена гемагглютинаина использовали метод прижизненной иммунофлюоресценции. На рис. 2 и 3 изображена культура клеток миеломы, инфицированная вирусом гриппа А H3N2, с оценкой мембранной экспрессии гемагглютинаина при помощи прижизненной иммунофлюоресценции.

На рис. 2 изображена культура клеток миеломы, инфицированная вирусом, обработанная мка к Н3 и антимышинными IgG, мечеными ФИТЦ. Экспрессия

Рис. 2. Клетки миеломы, инфицированные вирусом гриппа А H3N2, с оценкой мембранной экспрессии гемагглютинаина при помощи прижизненной иммунофлюоресценции. Использовали мышинные мка к Н3 и антимышинные IgG, меченые ФИТЦ

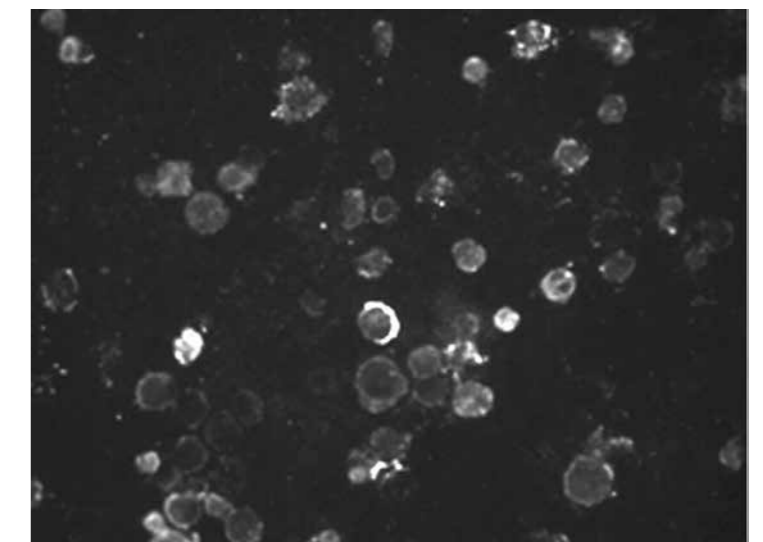


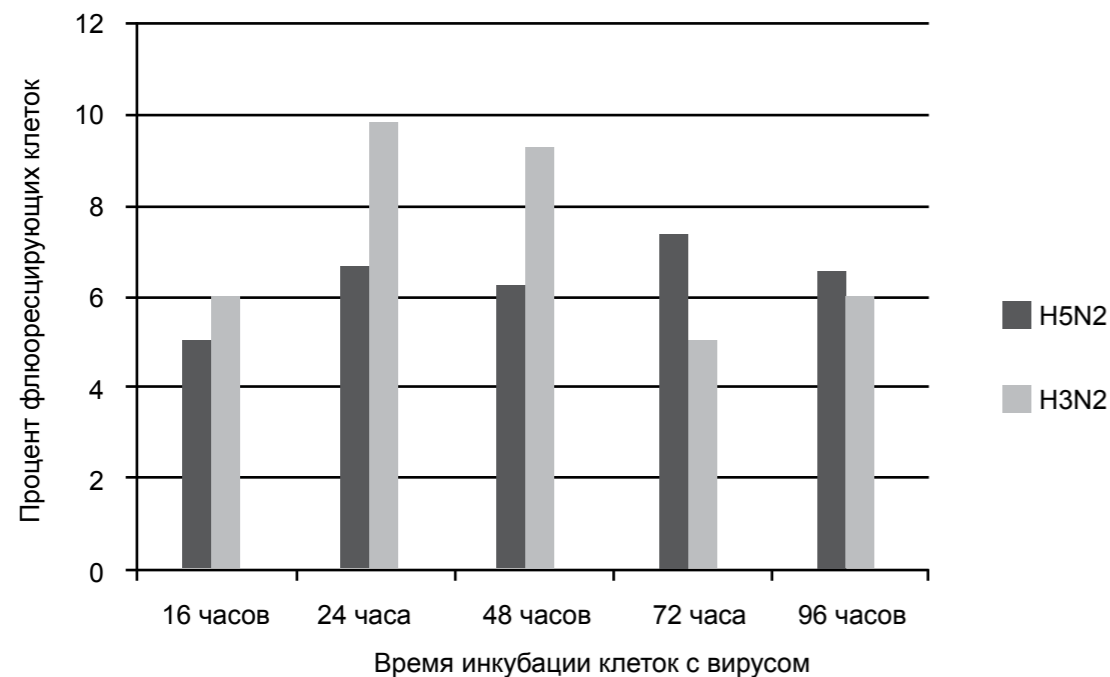


Рис. 3. Клетки миеломы, инфицированные вирусом гриппа А H3N2, с оценкой мембранной экспрессии гемагглютиниона при помощи прижизненной иммунофлюоресценции. Использовали контрольные неиммунные сыворотки и антимышьиные IgG, меченые ФИТЦ

гемагглютиниона наблюдается в виде флюоресценции мембраны клеток. На рис. 3 изображена культура клеток миеломы, инфицированная вирусом, обработанная контрольной сывороткой неиммунных мышей и антимышьиными IgG, мечеными ФИТЦ. Флюоресценции мембраны нет.

Динамику экспрессии гена гемагглютиниона оценивали методом непрямого ИФА через 16, 24, 48 и 72 ч после заражения клеточной культуры вирусами гриппа А H5 и H3. На рис. 4 изображена динамика экспрессии гена гемагглютиниона вирусов гриппа А подтипов

Рис. 4. Динамика экспрессии гемагглютиниона по проценту флюоресцирующих клеток



H3 и H5 в клетках миеломы по проценту флюоресцирующих клеток. При визуальной оценке флюоресценции установлено, что средний процент флюоресцирующих клеток при заражении вирусом гриппа А H5N2 достигал значения 7 %, вирусом H3N2 – 8 %. Максимальные значения флюоресценции при инфицировании вирусом гриппа А H3N2 отмечались спустя 24–48 ч после инфицирования и достигали значения 10,9 %. При инфицировании вирусом H5N2 максимальное значение флюоресценции наблюдалось через 72 ч после инфицирования (8,2 %).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана способность вирусов гриппа А субтипов H5N2 и H3N2 инфицировать клетки линии SP2/0-Ag.14 миеломы мыши генотипа Balb/c, что приводит к экспрессии гена гемагглютиниона. С помощью методов непрямого ИФА и прижизненной иммунофлюоресценции начало экспрессии детектируется через 16 ч после заражения клеток вирусом гриппа А, а максимального значения она достигает спустя 24–48 ч после заражения. При этом данные, полученные при постановке прижизненной иммунофлюоресценции, указывают на локализацию гемагглютиниона на мембране инфицированных клеток. Таким образом, культура клеток миеломы мыши SP2/0-Ag.14 генотипа Balb/c может быть использована в качестве системы презентации мембранных вирусспецифических антигенов вируса гриппа А для оценки активности противоклеточных эффекторов иммунной защиты (цитотоксических Т-лимфоцитов) [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahlers J.D., Belyakov I.M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory // Blood. – 2010. – Vol. 115, № 9. – P. 1678–1689.
- Emma P., Kamen A. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures // Biotechnol Prog. – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 275–284.
- Koup R.A., Douek D.C. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2011 Sep; 1(1):a007252. – URL: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/1/1/a007252.full.pdf+html>.

INFLUENZA A VIRUS HEMAGGLUTININ EXPRESSION IN INFECTED MURINE MYELOMA CELL LINE SP2/0-AG.14

A.S. Bandelyuk¹, E.S. Sedova², I.Yu. Gribova³, I.B. Yesmagambetov⁴, B.V. Novikov⁵

¹Junior Researcher, FGBI «Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Moscow, e-mail: alinabond88@mail.ru

²Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Moscow

³Junior Researcher, FGBI «Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Moscow

⁴Junior Researcher, FGBI «Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Moscow

⁵Leading Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI «Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Moscow

SUMMARY

Membrane expression of H3 and H5 influenza A virus hemagglutinin gene in murine myeloma cell line SP2/0-Ag.14 of Balb/c genotype was studied. Hemagglutinin gene expression was detected 16 hours post infection by indirect immunosorbent assay. Using intravital immunofluorescence assay peak membrane expression was demonstrated within 24–48 hours of incubation of cells with the virus.

Key words: hemagglutinin, membrane expression, indirect ELISA, immunofluorescence.

INTRODUCTION

Study of anticellular immune response in viral infections is complicated by the need for using singenic cells, as cytotoxic T-cells are MHC-restricted. When evaluating

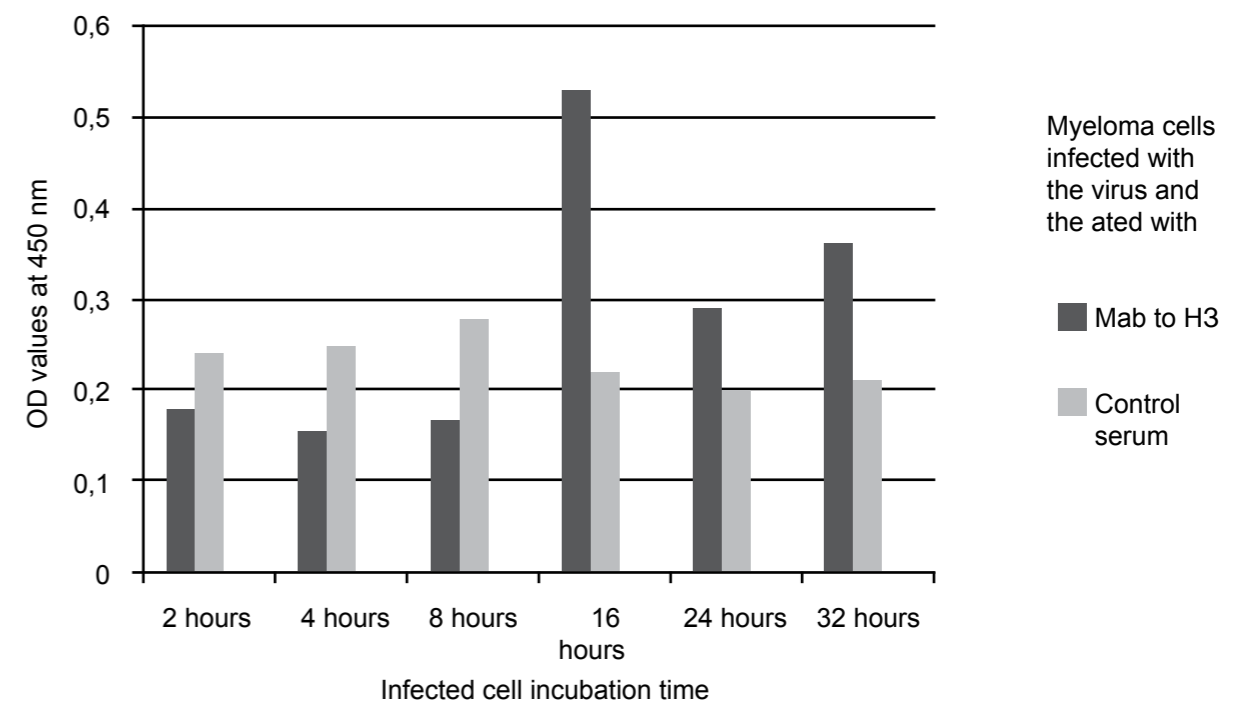
protective properties of novel candidate vaccines the cell line used as target cells should be of the same genotype as the animal models involved [1]. Therefore, study of murine myeloma cells SP2/0-Ag.14 of Balb/c genotype infected with influenza A virus as potential target cells for cytolytic activity of immunocompetent cells in vaccinated mice of the same genotype was of great interest.

The objective of this work was to assess hemagglutinin gene expression at the membranes of murine myeloma cells SP2/0-Ag.14 of Balb/c genotype infected with influenza A virus.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. Two subtypes of influenza A virus were used: A/Aichi/2/68(H3N2) and A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84(H5N2). SP2/0 myeloma cells were infected with influenza virus at the rate of 1 plaque-forming

Fig. 1. Influenza A virus hemagglutinin gene expression in myeloma cells SP/0-Ag.14



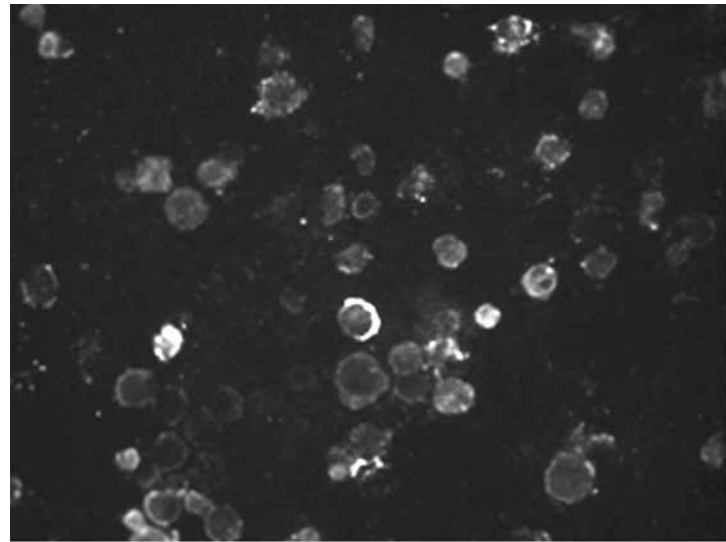


Fig. 2. Myeloma cells infected with H3N2 A influenza virus with hemagglutinin membrane expression assessed using intravital immunofluorescence. Mouse Mab to H3 and FITC labeled anti-mouse IgG were used

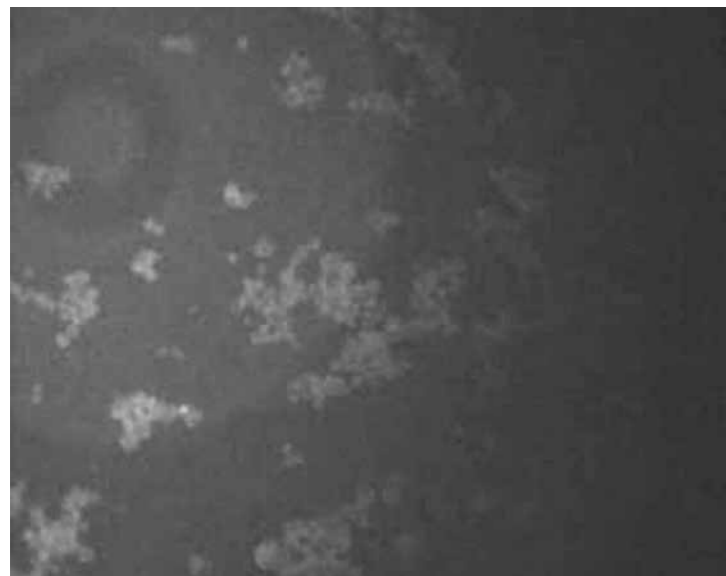
unit (1 PFU) per cell. The infected cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂ and membrane expression of hemagglutinin gene was evaluated using indirect immunosorbent assay (ELISA) and intravital immunofluorescence.

Cells. Murine myeloma cell line SP2/0-Ag.14 of Balb/c genotype was used.

Antibodies. Murine monoclonal antibodies (Mab) to H3N2 A influenza virus hemagglutinin (Sino Biological Inc., 11056-MM03), murine Mab to H5N1 A influenza virus hemagglutinin (Sino Biological Inc., 11048-MM01), control sera from non-immune mice, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma, A4416), fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled polyclonal secondary antibodies against mouse IgG (Abcam, ab6785).

Indirect ELISA. For indirect ELISA [2] infected cells were fixed with 0.1% glutaraldehyde (30 min, at room temperature). Residual active aldehyde groups were blocked with glycine (30 min, at room temperature).

Fig. 3. Myeloma cells infected with H3N2 A influenza virus with hemagglutinin membrane expression assessed using intravital immunofluorescence. Control non-immune sera and FITC labeled anti-mouse IgG were used



Phosphate buffer solution (PBS, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,2–7,4) was used for washing the cells. The cells were incubated with primary antibodies against H3 and H5 A influenza virus hemagglutinins and with control non-immune sera during 1 hour at 37 °C. Following washing with PBS the cells were incubated with secondary anti-mouse antibodies during 1 hour at 37 °C. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-mouse antibodies substrate solution (tetramethylbenzidine) was added to the mixture and incubated for 15 minutes in a dark place. The reaction was terminated using 4M H₂SO₄. Optical density was measured at 450 nm. Immunofluorescence assay was conducted with FITC labeled anti-mouse IgG as secondary antibodies using inverted microscope Olympus IX71 at 400–250 nm.

Intravital immunofluorescence. Evaluation of influenza A virus hemagglutinin gene expression in infected cells was performed 16 hours post infection by intravital immunofluorescence. For the test the infected cell suspension was incubated with primary antibodies to influenza A virus hemagglutinin for 30 minutes at 4°C. Unbound antibodies were washed using saline supplemented with 10% fetal calf serum. The suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C followed by the removal of supernatant and addition of secondary antibodies (FITC labeled anti-mouse IgG) and incubated for 20 minutes at 37°C. Fluorescence was assessed after washing with saline solution supplemented with 10% fetal calf serum using inverted microscope Olympus IX71 at 400–250 nm.

Evaluation of influenza A virus hemagglutinin gene expression dynamics. Influenza A virus hemagglutinin gene expression was assessed using indirect ELISA. Myeloma cell line was infected with influenza A virus (H5N2 and H3N2) in order to get the following time points by the moment ELISA was run: 16, 24, 48 and 72 hours post infection. The cells were treated with specific Mab to H5 and H3 and with secondary antibodies to FITC labeled mouse IgG. Total number of cells and number of fluorescent cells were counted visually within the vision field of the microscope (x20 magnification). Four vision fields were examined for each time point.

RESULTS AND DISCUSSION

Hemagglutinin gene expression in infected cells was assessed by indirect ELISA 2, 4, 8, 16, 24 and 32 hours post infection using MAb to H3N2 A influenza virus hemagglutinin. Optical density values (OD) in infected myeloma cells treated with Mab to H3 and with control non-immune murine serum. It was demonstrated that 2, 4 and 8 hours post infection OD values in test samples (OD=0,16) did not exceed OD values of the control serum (OD=0,25). Significant difference between the test and control samples was observed 16 hours post infection (OD=0,53 with Mab, OD=0,23 with the control serum) and maintained for up 32 hours post infection.

Intravital immunofluorescence was also involved for the evaluation of membrane expression of hemagglutinin gene. Myeloma cell line infected with H3N2 A influenza virus with hemagglutinin membrane expression assessed using intravital immunofluorescence is presented in Fig. 2 and 3.

Myeloma cells infected with the virus, treated with Mab to H3 and FITC labeled anti-mouse IgG are presented in Fig. 2. Hemagglutinin expression is demonstrated as fluorescent cell membrane. Fig. 3 presents myeloma cells infected with the virus, treated with the control

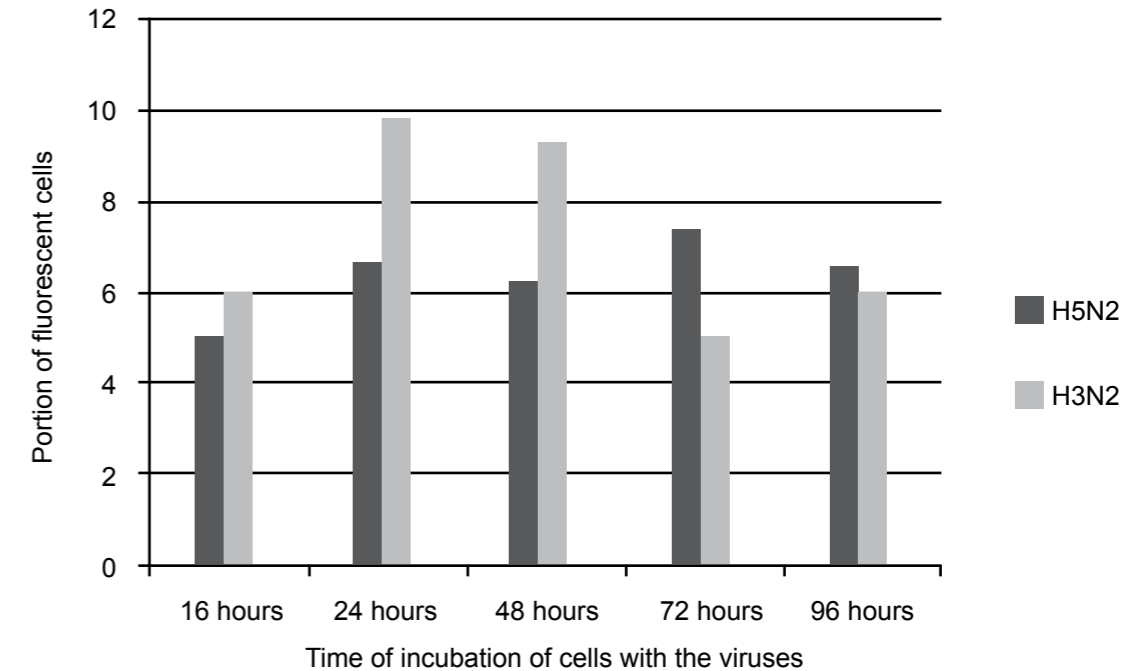


Fig. 4. Hemagglutinin expression dynamics by portion of fluorescent cells

non-immune serum and FITC labeled anti-mouse IgG. Fluorescence of the membrane is not observed.

It was observed. Hemagglutinin gene expression dynamics was assessed by indirect ELISA 16, 24, 48 and 72 hours post infection of the cell line with H5 and H3 influenza A viruses. H3 and H5 influenza A virus hemagglutinin gene expression dynamics in myeloma cells is presented in Fig. 4 by portion of fluorescent cells. Visual evaluation showed that mean portion of fluorescent cells infected with H5N2 A influenza virus reached 7%, with H3N2 – 8%. Maximum fluorescence of cells infected with H3N2 A influenza virus was observed 24–48 hours post infection and amounted to 10,9%. Maximum fluorescence with H5N2 virus was observed 72 hours post infection (8,2%).

CONCLUSION

Ability of influenza A viruses of subtypes H5N2 and H3N2 to infect SP2/0-Ag.14 murine myeloma cells of Balb/c genotype resulting in hemagglutinin gene expression was demonstrated. Using indirect ELISA and intravital immunofluorescence the onset of expression was detected 16 hours post infection of cells with influenza A virus with its peak falling within 24-48 hours post infection.

Data generated by intravital immunofluorescence test testify to the hemagglutinin location at the infected cell membranes. Thus, SP2/0-Ag.14 murine myeloma cells of Balb/c genotype can be used as a presentation system for membrane virus-specific influenza A antigens for the assessment of anticellular immune effectors (cytotoxic T-cells) [3].

REFERENCES

- Ahlers J.D., Belyakov I.M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory // *Blood*. – 2010. – Vol. 115, № 9. – P. 1678–1689.
- Emma P., Kamen A. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures // *Biotechnol Prog.* – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 275–284.
- Koup R.A., Douek D.C. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2011 Sep; 1(1):a007252. – URL: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/1/1/a007252.full.pdf+html>.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ЛАКТОБАКТЕРИЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОПРЕПАРАТОВ

С.А. Гужвинская

ведущий научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук, ННЦ «ИЭКВМ», г. Харьков, Украина, e-mail: probiotic@vet.kharkov.ua

РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные о поиске перспективных штаммов лакто- и бифидобактерий, изучены их антагонистические свойства по отношению к условно-патогенной микрофлоре и отобраны микроорганизмы для разработки пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотики, бифидобактерии, лактобактерии.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы для профилактики и лечения, а также повышения продуктивности животных широко применяются пробиотики – бактериальные препараты из живых микробных культур. Эффективность пробиотиков обусловлена улучшением метаболических процессов в пищеварительном тракте, полным усвоением питательных веществ, повышением сопротивляемости организма, а также их антагонистическим действием на патогенную микрофлору. Препараты этой группы не вызывают побочных реакций в организме животных, не имеют противопоказаний к применению. Кроме того, в комплексе с ветеринарно-санитарными мероприятиями они оказывают оздоровительное влияние на микробиоценоз в животноводческих помещениях.

Практическое использование микробных культур-антагонистов для борьбы с болезнетворными бактериями предложил в 1903 г. И.И. Мечников.

Механизм действия пробиотиков обусловлен их способностью активно заселять желудочно-кишечный тракт, синтезировать биологически активные метабо-

литы, которые обеспечивают их выживаемость в борьбе с патогенными микроорганизмами.

При создании пробиотиков необходимо подбирать штаммы из большого количества бактерий, которые обладают высокой скоростью роста и быстро приживаются в среде желудочно-кишечного тракта. Для достижения намеченной цели была поставлена задача – изучить антагонистические свойства культур – кандидатов в пробиотик в отношении условно-патогенной микрофлоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований были штаммы: *Lactobacillus plantarum* 7, *L. plantarum* 19, *L. plantarum* 7-317, *L. casei* 27, *L. delbrueckii* 8, *L. casei* var. *rhamnosus* 14, *L. casei* var. *hamnosus* 9, *Bifidobacterium adolescentis* 23, *B. infantis* 14, *B. adolescentis* 17-316, *B. adolescentis* 17, *B. longum* 23, *B. bifidum* 1, *B. adolescentis* 3 п, *Streptococcus lactis* 5.

Антагонистическую активность молочнокислых бактерий по отношению к патогенной микрофлоре *E. coli* K 99, *S. aureus*, *Str. epidermidis*, *Salmonella dublin*, *Ps. aeruginosa* определяли по методу Н.С. Егорова (1997), пробиотических культур – общепринятыми методами. Скорость свертываемости молока и кислотообразующие свойства изучали с помощью метода Е.И. Квасникова [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отборе пробиотической микрофлоры особое значение уделяли изучению способности штаммов увеличивать численность популяции в молоке и синтезировать в нем кислоту, а также спектру антагонистических свойств. Выявлены значительные вариации между различными штаммами лакто- и бифидобактерий относительно их биологических свойств. Для использования в составе пробиотиков отбирали

Таблица 1. Характеристика биологических свойств молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии	Урожайность клеток в молоке, КОЕ/см ³	Образование кислоты, °Т	Скорость свертывания молока, ч
<i>L. plantarum</i> 7	10 ⁸	140	12
<i>L. plantarum</i> 19	10 ⁵	62	56
<i>L. casei</i> 27	10 ⁸	160	48
<i>B. adolescentis</i> 17	10 ⁸	114	24
<i>B. longum</i> 23	10 ⁶	88	56
<i>St. lactis</i> 5	10 ⁷	64	78

Таблица 2. Антагонистическая активность штаммов лактобактерий и бифидобактерий

(M ± m, n = 5)

Бактерии	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм				
	<i>E. coli</i> K 99	<i>S. aureus</i>	<i>Str. epidermidis</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. dublin</i>
<i>L. plantarum</i> 7	20,8±1,87	21,7±1,09	22,3±1,48	18,0±0,57	0
<i>L. plantarum</i> 19	10,9±1,01	12,6±0,54	11,1±0,33	10,9±0,77	0
<i>L. casei</i> 27	20,1±0,97	24,7±1,87	16,7±0,57	17,3±1,21	0
<i>L. delbrueckii</i> 8	10,1±0,87	12,3±1,44	11,7±0,34	7,5±0,77	0
<i>L. casei</i> var. <i>hamnosus</i> 9	9,0±0,78	8,3±0,69	7,5±0,54	9,1±0,47	0
<i>B. adolescentis</i> 23	10,1±0,51	12,5±0,43	12,1±0,67	18,4±0,77	0
<i>B. infantis</i> 14	8,8±0,98	7,9±0,87	9,5±0,23	7,9±0,32	0
<i>B. adolescentis</i> 17-316	24,7±1,23	20,1±0,32	22,4±0,71	21,3±0,57	0
<i>B. adolescentis</i> 17	20,7±1,81	22,2±0,71	19,8±0,77	18,5±0,98	0
<i>B. longum</i> 23	18,2±0,44	14,7±1,00	17,1±0,34	10,5±1,01	0
<i>St. lactis</i> 5	15,7±0,81	14,3±0,77	12,9±0,57	11,7±0,98	0
<i>B. adolescentis</i> 3 п	21,5±0,76	20,5±0,27	22,4±0,65	20,4±0,77	0
<i>B. bifidum</i> 1	15,4±0,78	12,5±0,92	11,7±0,77	18,6±0,34	0
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> 14	8,7±0,84	9,8±0,95	5,9±1,40	7,7±0,81	0
<i>L. plantarum</i> 7-317	20,1±0,57	22,5±1,02	24,9±0,77	17,5±0,57	0
<i>L. plantarum</i> 22	23,3±0,51	19,8±1,77	22,3±0,69	20,1±0,32	0
<i>B. subtilis</i> 1	18,4±0,33	17,0±1,03	20,1±0,87	16,3±0,65	0

культуры-кандидаты, характеристика которых приведена в табл. 1.

Результаты исследований показали, что штаммы лактобактерий имели свойство свертывать молоко за 12–56 ч и образовывали кислоту от 62°Т до 160°Т. У культур бифидобактерий кислотообразование наблюдалось от 88°Т до 114°Т, и скорость свертывания молока была от 24 до 56 ч. Молочнокислые кокки образовывали кислоту от 64°Т до 88°Т, и скорость свертывания молока составила от 56 до 78 ч. Экспериментально доказано, что выделенные культуры молочнокислых бактерий отличаются по степени способности свертывать молоко и степени кислотообразования, и между ними наблюдается прямая корреля-

тивная связь. Большое значение имеет способность молочнокислых бактерий, отличающихся высокой требовательностью к условиям культивирования и составу питательных сред, развиваться в молоке и увеличивать численность своих клеточных популяций. Отобранные штаммы свертывают стерильное молоко в течение 1–4 сут. с накоплением в нем от 10⁶ до 10⁸ КОЕ/см³ популяций своих клеток.

Результаты определения антагонистической активности лактобактерий и бифидобактерий представлены в табл. 2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, штаммы *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum*

Таблица 3. Соотношение антагонистически активных лактобацилл и бифидобактерий к патогенной микрофлоре

Микроорганизмы	Количество штаммов					
	высокоактивных		среднеактивных		низкоактивных	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>E. coli</i> K 99	7	41,18	7	41,18	3	17,64
<i>S. aureus</i>	6	35,23	8	47,06	3	17,64
<i>Str. epidermidis</i>	6	35,23	8	47,06	3	17,64
<i>S. dublin</i>	3	17,65	10	58,82	4	23,53
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	–	0	–	0	–

22, *B. adolescentis* 3 п проявляли высокую антагонистическую активность, зоны задержки роста колебались в пределах 20,0–25,0 мм; среднеактивными были штаммы *B. adolescentis* 23, *St. lactis* 5, *B. longum* 23, *B. subtilis* 1, *L. delbrueckii* 8, *L. plantarum* 19, зоны задержания роста колебались в пределах 10,0–19,0 мм; низкоактивными оказались штаммы *L. casei* var. *hamnosus* 9, *L. plantarum* 19, *L. casei* var. *rhamnosus* 14, *B. infantis* 14. Таким образом, из 17 штаммов 7 (41,2 %) проявили высокую антагонистическую активность, 6 штаммов (35,3 %) – среднюю антагонистическую активность и 5 штаммов (23,5 %) – низкоактивные.

Процент активности лактобацилл и бифидобактерий к патогенной микрофлоре представлены в табл. 3.

Результаты исследования показали значительные вариации в уровне антагонистической активности различных штаммов молочнокислых бактерий в спектре подавляемой ими микрофлоры. Результаты, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что наибольший процент высокоактивных штаммов был к *E. coli* K 99 – 7 штаммов (41,18 %), к *S. aureus* и *Str. epidermidis* – по 6 штаммов (35,23 %), к *S. dublin* – 3 штамма (17,65 %); среднеактивных к *S. dublin* – 10 штаммов (58,82 %), к *S. aureus* и *Str. epidermidis* – по 8 штаммов (47,06 %), к *E. coli* K 99 – 7 штаммов (41,18 %). Штаммы молочнокислых бактерий оказались низкоактивными к *S. dublin* – 4 штамма (23,53 %), к *E. coli* K 99, *S. aureus* и *Str. epidermidis* – по 3 штамма (17,64 %). Следует отметить, что все штаммы не проявляли антагонистическую активность к *Ps. aeruginosa*. Установлено, что при исследовании 17 микроорганизмов высокую антагонистическую активность к патогенной микрофлоре проявили

41,2 % штаммов, среднюю антагонистическую активность – 35,3 % бактерий и низкоактивную – 23,5 %.

Таким образом, на основании изучения биологических свойств культур – кандидатов в пробиотики были отобраны штаммы бактерий – *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum* 22, *B. adolescentis* 3 п.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штаммы *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum* 22, *B. adolescentis* 3 п обладают высокой антагонистической активностью, благодаря этим свойствам являются перспективными для создания пробиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Р. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
2. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 384 с.
3. Сидоров М.А., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками // Ветеринария. – 2000. – № 11. – С. 17–22.
4. Тараканов Б.В. Механизм действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных // Ветеринария. – 2000. – № 1. – С. 47–54.
5. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. – Киев, 2005. – 361 с.

UDC 619:631.147:618.19-002

PERSPECTIVE BIFIDOBACTERIUM AND LACTIC ACID BACTERIUM STRAIN SEARCH FOR BIOLOGICAL DEVELOPMENT

S.A. Guzhvinskaya

leading researcher, Candidate of Science (Agricultural Science), National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine, e-mail: probiotic@vet.kharkov.ua

SUMMARY

The paper provides the information about the search of perspective bifidobacterium and lactic acid bacterium strains, the study of their antagonist properties in relation to the opportunistic flora and the choice of microorganisms for probiotic development.

Key words: probiotics, bifidobacteria, lactic acid bacteria.

INTRODUCTION

Over the past few years probiotics, bacterial preparations made of live microbial cultures, have been widely used for animal disease prevention and treatment as well as for the increase of animal productivity. Probiotic

effectiveness results from the improvement of metabolic processes in the digestive tract, complete nutrition, body resistance increase as well as from the probiotic antagonistic effect on the pathogenic flora. Preparations of this group cause no side reactions in animals and have no contraindications. To add to this, together with veterinary and sanitary measures they have a favorable effect on microbiocenosis in animal facilities.

Common use of microbial cultures-agonists for malignant bacteria control was suggested by I.I. Mechnikov in 1903.

Mode of action of probiotics is based on their ability to actively colonize the digestive tract, to synthesize active metabolites which helps them to survive during the pathogenic microorganism control.

While developing probiotics it is necessary to choose such strains from a big number of bacteria which have a high growth rate and which can be quickly established

Table 1. Characteristics of Lactic Acid Bacteria Biological Properties

Lactic acid bacteria	Cell yield in milk, CFU/cm ³	Acid formation, °T	Milk coagulation rate, hours
<i>L. plantarum</i> 7	10 ⁸	140	12
<i>L. plantarum</i> 19	10 ⁵	62	56
<i>L. casei</i> 27	10 ⁸	160	48
<i>B. adolescentis</i> 17	10 ⁸	114	24
<i>B. longum</i> 23	10 ⁶	88	56
<i>St. lactis</i> 5	10 ⁷	64	78

in the digestive tract. To accomplish the purpose the task to study antagonist properties in relation to the opportunistic flora was set.

MATERIALS AND METHODS

The following strains served research objects: *Lactobacillus plantarum* 7, *L. plantarum* 19, *L. plantarum* 7-317, *L. casei* 27, *L. delbrueckii* 8, *L. casei* var. *rhamnosus* 14, *L. casei* var. *hamnosus* 9, *Bifidobacterium adolescentis* 23, *B. infantis* 14, *B. adolescentis* 17-316, *B. adolescentis* 17, *B. longum* 23, *B. bifidum* 1, *B. adolescentis* 3п, *Streptococcus lactis* 5.

Lactic acid bacteria antagonistic activity in relation to pathogenic flora *E. coli* K 99, *S. aureus*, *Str. epidermidis*, *Salmonella dublin*, *Ps. aeruginosa* was determined using N.S. Egorov's method (1997) and probiotic culture

antagonistic activity – using common methods. Milk coagulation rate as well as acid forming properties were studied using Ye.I. Kvasnikov's method [2].

RESULTS AND DISCUSSIONS

While choosing the probiotic flora special attention was paid to the study of the strains' ability to give rise to colonies in milk and to synthesize acid in it as well as to the study of analogous properties. Some significant variations of different lacto acid bacterium and bifidobacterium strains in relation to their biological properties were detected. Cultures-candidates with the properties provided in Table 1 were selected for the use in probiotics.

Test results showed that lacto acid bacterium strains tended to coagulate milk within 12–56 hours and formed

Table 2. LAB and Bifidobacterium Strains Antagonistic Activity

(M ± m, n = 5)

Bacteria	Test-culture inhibition zone diameter, mm				
	<i>E. coli</i> K 99	<i>S. aureus</i>	<i>Str. epidermidis</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. dublin</i>
<i>L. plantarum</i> 7	20,8±1,87	21,7±1,09	22,3±1,48	18,0±0,57	0
<i>L. plantarum</i> 19	10,9±1,01	12,6±0,54	11,1±0,33	10,9±0,77	0
<i>L. casei</i> 27	20,1±0,97	24,7±1,87	16,7±0,57	17,3±1,21	0
<i>L. delbrueckii</i> 8	10,1±0,87	12,3±1,44	11,7±0,34	7,5±0,77	0
<i>L. casei</i> var. <i>hamnosus</i> 9	9,0±0,78	8,3±0,69	7,5±0,54	9,1±0,47	0
<i>B. adolescentis</i> 23	10,1±0,51	12,5±0,43	12,1±0,67	18,4±0,77	0
<i>B. infantis</i> 14	8,8±0,98	7,9±0,87	9,5±0,23	7,9±0,32	0
<i>B. adolescentis</i> 17-316	24,7±1,23	20,1±0,32	22,4±0,71	21,3±0,57	0
<i>B. adolescentis</i> 17	20,7±1,81	22,2±0,71	19,8±0,77	18,5±0,98	0
<i>B. longum</i> 23	18,2±0,44	14,7±1,00	17,1±0,34	10,5±1,01	0
<i>St. lactis</i> 5	15,7±0,81	14,3±0,77	12,9±0,57	11,7±0,98	0
<i>B. adolescentis</i> 3 n	21,5±0,76	20,5±0,27	22,4±0,65	20,4±0,77	0
<i>B. bifidum</i> 1	15,4±0,78	12,5±0,92	11,7±0,77	18,6±0,34	0
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> 14	8,7±0,84	9,8±0,95	5,9±1,40	7,7±0,81	0
<i>L. plantarum</i> 7-317	20,1±0,57	22,5±1,02	24,9±0,77	17,5±0,57	0
<i>L. plantarum</i> 22	23,3±0,51	19,8±1,77	22,3±0,69	20,1±0,32	0
<i>B. subtilis</i> 1	18,4±0,33	17,0±1,03	20,1±0,87	16,3±0,65	0

Table 3. Correspondence of Antagonistically active LABs and Bifidobacteria to Pathogenic Flora

Microorganisms	Number of strains					
	highly active		mid active		low active	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>E. coli</i> K99	7	41,18	7	41,18	3	17,64
<i>S. aureus</i>	6	35,23	8	47,06	3	17,64
<i>Str. epidermidis</i>	6	35,23	8	47,06	3	17,64
<i>S. dublin</i>	3	17,65	10	58,82	4	23,53
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	–	0	–	0	–

acid from 62°Т to 160°Т. As for the bifidobacterium cultures, acid formation was from 88°Т to 114°Т and milk coagulation rate was from 24 to 56 hours. LAB cocci formed acid from 64°Т to 88°Т and milk coagulation rate was within 56–78 hours. It was experimentally proved that the isolated LAB cultures differ from each other in milk coagulation and acid formation rates, and there is a direct correlation between them. The ability of LABs, which are particular about the cultivation conditions and the nutrient medium contents, to develop in milk and to give rise to cell colonies is of considerable importance. Selected strains coagulate sterile milk within 14 days with the amount of cells from 10⁶ to 10⁸ CFU/cm³.

LAB and bifidobacterium antagonistic activity test results are provided in Table 2.

As Table 2 shows, strains *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum* 22, *B. adolescentis* 3 n had high antagonistic activity, growth inhibition zone was 20,0–25,0 mm; strains *B. adolescentis* 23, *St. lactis* 5, *B. longum* 23, *B. subtilis* 1, *L. delbrueckii* 8, *L. plantarum* 19 were mid active with growth inhibition zone 10,0–19,0 mm; strains *L. casei* var. *hamnosus* 9, *L. plantarum* 19, *L. casei* var. *rhamnosus* 14, *B. infantis* 14 appeared to be low active. Therefore, 7 strains out of 17 (41,2%) demonstrated high antagonistic activity, 6 strains (35,3%) – moderate antagonistic activity and 5 strains (23,5%) – were low active.

LAB and bifidobacterium activity rate against the pathogenic flora is provided in Table 3.

Test results showed significant variations in the level of antagonistic activity of different LAB strains in different inhibited flora. Results, provided in Table 3 show that there were 7 highly active strains (41,18%) against *E. coli* K99, 6 strains (35,23%) against each of *S. aureus* and *Str. epidermidis*, 3 strains (17,65%) against *S. dublin*; there were 10 mid active strains (58,82%) against *S. dublin*, 8 strains (47,06%) against each of *S. aureus* and *Str. epidermidis*,

and 7 strains (41,18%) against *E. coli* K 99. 4 LAB strains (23,53%) appeared to be low active against *S. dublin*, and 3 strains (17,64%) against each of *E. coli* K99, *S. aureus* and *Str. epidermidis*. It is worth mentioning that none of the strains demonstrated antagonistic activity against *Ps. aeruginosa*. During the study of 17 microorganisms it has been established that 41,2% of strains demonstrated high antagonistic activity against the pathogenic flora, 35,3% of bacteria – medium antagonistic activity and 23,5% – low antagonistic activity.

Therefore, on the basis of probiotic culture-candidate biological property studies the following bacteria strains were selected: *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum* 22, *B. adolescentis* 3n.

CONCLUSION

Strains *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum* 22, *B. adolescentis* 3 n have the high level of antagonistic activity and thanks to this property they seem to be perspective for probiotic development.

REFERENCES

1. Bannikova L.A., Korolyova N.S., Semnikhina V.R. Microbiological basic principles of milk production. – M.: Agropromizdat, 1987. – 400 p.
2. Kvasnikov Ye. I., Nesterenko O. A. Lactic-acid bacteria and their use. – M.: Nauka, 1975. – 384 p.
3. Sidorov M.A., Subbotin V.V., Danilevskaya N.V. Normal animal flora and its correction using probiotics // Veterinariya. – 2000. – № 11. – P. 17–22.
4. Tarakanov B.V. Mode of action of probiotics in animals and their digestive tract flora // Veterinariya. – 2000. – № 1. – P. 47–54.
5. Yankovsky D.S. Human microbial ecology: modern methods of its maintenance and regeneration. – Kiev, 2005. – 361 p.

УДК 610:616.98:579.841.93-076

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ПРИ БРУЦЕЛЛЕЗЕ ЖИВОТНЫХ

С.Г. Канатбаев¹, В.Б. Тен², Е.К. Туяшев³, Е.С. Нысанов⁴

¹ доктор биологических наук, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан, e-mail: Uralskaya.nivs@mail.ru

² доктор ветеринарных наук, профессор, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

³ директор, кандидат ветеринарных наук, доцент, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

⁴ научный сотрудник, Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, ТОО «КазНИВИ», г. Уральск, Республика Казахстан

РЕЗЮМЕ

В статье приведены данные об активности иммуностимуляторов как самостоятельно, так и в комплексе с пролонгированным антибиотиком в борьбе с бруцеллезом, влияние их на антителообразование. Испытания проводились как в экспериментальных, так и в производственных условиях. Комплекс, состоящий из препарата с антибиотиком, усиливает резистентность, повышает устойчивость животного к бруцеллезному агенту на 60–100 % и обеспечивает оздоровление хозяйств от бруцеллезной инфекции за короткий период.

Ключевые слова: бруцеллез, иммуностимулятор, антибиотик, резистентность, благополучие.

UDC 610:616.98:579.841.93-076

USE OF IMMUNOMODIFIERS FOR CONTROL OF ANIMAL BRUCELLOSIS

S.G. Kanatbayev¹, V.B. Ten², Ye.K. Tuyashev³, Ye.S. Nysanov⁴

¹ Doctor of Science (Biology), West Kazakhstan Research Veterinary Station, TОО «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan, e-mail: Uralskaya.nivs@mail.ru

² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, West Kazakhstan Research Veterinary Station, TОО «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

³ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Assistant Professor, West Kazakhstan Research Veterinary Station, TОО «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

⁴ Researcher, West Kazakhstan Research Veterinary Station, TОО «KazNIVI», Uralsk, Republic of Kazakhstan

SUMMARY

The information on activity of immunopotentiators alone and in combination with a prolonged antibiotic for control of brucellosis and their effect on antibody creation is presented in the paper. Tests were carried out under both experimental and production conditions. The combination of the preparation with an antibiotic increases resistance of animals to brucellosis agent by 60–100% and provides brucellosis-free situation on farms during a short period of time.

Key words: Brucellosis, immunopotentiator, antibiotic, resistance, brucellosis-free situation.

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез относится к наиболее распространенным хроническим инфекционным заболеваниям, наносящим большой экономической и социальной ущерб.

К нему восприимчивы все виды домашних, сельскохозяйственных, многие из диких животных, а также некоторые птицы. В условиях эксперимента им заражаются и некоторые холоднокровные (черепахи, ящерицы, лягушки и др.).

В Республике Казахстан бруцеллез наиболее распространен среди крупного и мелкого рогатого скота, верблюдов, меньше – среди свиней, лошадей.

Появление бруцеллеза в хозяйстве среди перечисленных животных весьма тормозит воспроизводство стада, отрицательно влияет на племенное дело, во всех случаях наносит колоссальный экономический ущерб.

Таблица 1. Состояние иммунитета морских свинок к бруцеллезу после введения иммуномодулятора

№ группы	Количество				% иммунных
	исследованных животных	исследованных органов	выделенных культур	иммунных животных	
1	5	45	18	1	20
2	5	45	12	2	40
3	5	45	9	3	60
4	5	45	–	5	100
5	5	45	32	–	–

Материальный урон, причиняемый бруцеллезом, связан со многими мероприятиями, необходимыми для выполнения: организационно-хозяйственными; ветеринарно-санитарными; специальными.

Нарушения при проведении перечисленных мероприятий осложняют проведение нормальных производственных процессов.

Кроме огромных материальных затрат требуется уделить особое внимание тому, чтобы инфекция была купирована в очаге и не находила выход для распространения в другие хозяйства, регионы, так как при этом заражаются не только животные, но и люди, загрязняется окружающая среда, нарушается равновесие в экосфере.

Заражение людей бруцеллезом приводит к длительной инвалидности, летальность может достигнуть 5 %. У больных бруцеллезом людей поражаются все жизненно важные органы: сердце, печень, почки, зрение, слух, суставы, костный мозг, центральная, нервная, мочеполовая системы и др.

В настоящее время повысились требования к продукции, употребляемой в пищу. Продукты питания не должны содержать вредные вещества и патогены. Возбудитель бруцеллеза, попав в организм человека, вызывает аллергическую перестройку организма. При повторном контакте с возбудителем в организме развиваются сильнейшие аллергические реакции, проявляющиеся в виде болезней отдельных органов, что приводит к нарушению функций сердца, зрения, слуха, нервной системы, желудочно-кишечной, опорно-двигательной и др. При попадании в организм антигенов может наблюдаться слабая и даже активная форма болезни. Поэтому люди, больные бруцеллезом, не должны употреблять в пищу продукты от больных животных.

Современные условия жизни требуют от ученых разработки экологически безопасных, технологичных, высокоэффективных препаратов, необходимых для сохранения ветеринарной безопасности.

В борьбе с инфекционными заболеваниями особую роль играют неспецифические факторы защиты (фагоцитоз), В- и Т-клетки их субпопуляции. При бруцеллезе главенствующая роль в борьбе с инфекцией принадлежит клеточной системе, поэтому целенаправленное регулирование ее возможно при введении в организм животных иммуностимуляторов и иммуномодуляторов. Они применяются либо самостоятельно, либо в комплексе с антибактериальными препаратами, антибиотиками, за счет чего усиливается не только активность последних (т.к. идет стимуляция иммунной системы), но и повышается продолжительность их действия. В результате перманентного воздействия иммуномодулятора на макроорганизм повышаются функции иммунной системы, т.е. усиливается роль естественных сил за счет увеличения числа лейкоцитов, активизации фагоцитоза, в результате чего подавляется размножение микроорганизмов. При сочетании применении иммуностимулятора с антибактериальными препаратами избирательно купируется размножение бруцелл или они уничтожаются. Включенный в состав иммуностимулятора с антибиотиком пролонгатор удлиняет их действие на определенный срок.

Ряд ученых применяли антибактериальный препарат в отарах, где зарегистрировано клиническое проявление бруцеллеза. Двукратная обработка животных позволила предохранить их от заражения бруцеллезом при контакте с больными овцематками. [1, 3]

Наиболее перспективными средствами, сдерживающими развитие инфекции, применяемыми

Таблица 2. Сравнительная проверка профилактической и лечебной эффективности препаратов при «заражении» мелкого рогатого скота культурой вакцинного штамма *Br melitensis* Rev-1

№ группы	Количество				% иммунных
	исследованных животных	исследованных органов	выделенных культур	иммунных животных	
1	5	70	1	4	80
2	5	70	–	–	100
3	5	70	3	4	80
4	5	70	4	4	80
5	5	70	43	5	0

для ускоренной профилактики бруцеллеза при остром инфекционном процессе, являются лечебно-профилактические препараты на основе пролонгированных антибиотиков в сочетании с иммуномодуляторами [4].

При исследовании животных, которым ввели иммуномодуляторы, было определено, что они освобождают организм в 30–50 % случаев от бруцелл, а в сочетании с антибактериальными препаратами активность повышается от 40 до 100 % в зависимости от кратности их применения [2, 5].

Целью исследования было изучение в экспериментальных и производственных условиях влияния иммуномодулятора в различных сочетаниях на организм животных с целью повышения устойчивости к бруцеллезной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные испытания проводились на морских свинках (25 гол.) и овцах (25 гол.), которых разбили на 5 групп и вводили им следующие препараты:

- 1 группе – препарат, стимулирующий в основном клеточный иммунитет (левамизол);
- 2 группе – комплекс препаратов (иммуномодулятор), стимулирующий клеточный иммунитет, удлиняющий его действие. Пролонгаторы – минеральные масла, ланолин;
- 3 группе – то же, что и второй группе, + антибиотик стрептомицин;
- 4 группе – то же, что и второй группе, + протективный антиген;
- 5 группе – препарат не вводили (служила контролем заражения).

Препараты вводили подкожно по 1 см³ в область правого паха за 72 ч до заражения 5-кратной инфицирующей дозой вирулентной культуры *Br. abortus* 54. Через 25 сут. после заражения все животные были убиты для бактериологического исследования органов (определения активности препаратов).

Производственные опыты проводились в крестьянских хозяйствах «Алмазный» и «Сарыой» на крупном (90 гол.) и мелком (400 гол.) рогатом скоте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что введение препаратов стимулирует организм морских свинок противостоять заражению: в 1 группе – 20 %; во 2 группе – 40 %; в 3 группе – 60 %; в 4 группе – 100 %; в 5 группе – 0 %.

В неблагополучном хозяйстве по бруцеллезу крупного рогатого скота было отобрано 90 коров, которым 4-кратно ввели иммуномодулятор с антибиотиками. Препарат вводили через каждые 10 сут. в заднюю треть шеи подкожно: животным до 100 кг живой массы по 1,5 мл; до 200 кг – по 3 мл; до 300 кг – по 4 мл; взрослым – по 6 мл.

В другом хозяйстве после 2-кратного исследования осталось 60 % коров (743), не реагирующих на бруцеллез, им 4-кратно ввели иммуномодулятор без антибиотиков, т.к. они давали продукцию (молоко). При последующем исследовании реагировало 12 коров (1,6 %), все они были сданы на убой, а оставшимся дополнительно 2-кратно ввели иммуномодулятор.

При дальнейшем исследовании реагировало 2 коровы (0,27 %), которые были сданы на убой.

В обоих случаях зимовка прошла успешно, абортос бруцеллезной этиологии выявлено не было.

Как видно из табл. 2, предложенный препарат из 2 группы имеет преимущество по сравнению с другими препаратами. Этот вариант препарата может быть использован в профилактике и лечении бруцеллеза мелкого рогатого скота.

Предложенное средство позволяет повысить эффективность профилактических и лечебных мероприятий при бруцеллезе овец, тем самым ускорить сроки оздоровления неблагополучных хозяйств.

Этот препарат испытали при проведении оздоровительных мероприятий в к/х «Сарыой» (400 гол. мелкого рогатого скота).

При первичном исследовании общий процент реагирующих на бруцеллез овец и коз составил 6 и 4 % соответственно. При третьем исследовании положительные результаты в реакции связывания комплекта (РСК) и Роз-Бенгал пробе (РБП) были также одинаковыми.

Необходимо отметить, что в этой же чабанской точке заболело бруцеллезом 3 члена семьи, и поэтому были организованы оперативные комплексные ветеринарно-медицинские, дезинфекционные мероприятия по ликвидации очага инфекции. После сдачи на убой всех положительно реагирующих животных всем оставшимся животным для санации организма 7-кратно ввели иммуномодулятор.

Через 2-3 недели после окончания введения препарата всех оставшихся овец и коз вакцинировали инактивированной вакциной производства ТОО «КазНИВИ». Последующее исследование животных проводили в апреле 2011 г., при этом положительно реагирующих не было, что свидетельствовало об эффективности проведенных оздоровительных мероприятий.

Иммуномодулятор в сочетании с антибиотиком и пролонгатором был использован в неблагополучном по бруцеллезу овец хозяйстве «Алмазный» Чингирлауского района.

В начале проведения оздоровительных мероприятий с применением иммуномодулятора были проведены диагностические исследования всего поголовья. В результате было выявлено 6,4 % реагирующих на бруцеллез животных, которые были удалены из отары.

Животным всех возрастных групп ввели иммуномодулятор в сочетании с антибиотиком и пролонгатором 6-кратно с интервалом 7 сут. При этом во время проведения оздоровительных мероприятий владельцу животных было рекомендовано построить загон для содержания овец в «условно чистом» месте.

Через 15 сут. после последнего введения препарата пробы от всех животных исследовали в реакции агглютинации (РА) и РСК. В результате было установлено, что 6-кратное введение лечебно-профилактического препарата позволило довести отару до полного отрицательного результата, в результате чего с хозяйства был снят карантин по бруцеллезу.

Следовательно, для оздоровления хозяйств от бруцеллезной инфекции в условиях отгонного животноводства необходимо строгое соблюдение организационно-хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий, ежемесячное исследование всего поголовья на бруцеллез, введение иммуномодулятора в сочетании с антибиотиком и пролонгатором для профилактики бруцеллеза.

Широкое распространение бруцеллеза, высокая контагиозность возбудителя, множественность факторов его передачи и способов заражения животных, несовершенство диагностики и профилактики, мер

борьбы с указанной инфекцией, социальная опасность болезни требуют от работников ветеринарной службы более внимательного подхода к разработке мер борьбы с данной инфекцией. При этом необходимо учитывать, что технология ведения животноводства в Республике Казахстан претерпевает серьезные изменения, в основном характеризующиеся совместным содержанием различных видов и возрастов животных (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, верблюды и др.) в одном фермерском хозяйстве, что затрудняет проведение диагностики и вакцинации.

Значительное распространение бруцеллеза среди мелкого рогатого скота в республике диктует необходимость разработки более эффективных мер сохранения благополучия и методов ликвидации болезни.

Имеющаяся на данный момент инструкция нацелена на проведение мероприятий по борьбе с бруцеллезом в зависимости от вида и возраста животных индивидуально, а совместное их содержание не позволяет их осуществлять. Поэтому необходимо внедрение новых схем применения спецпрофилактических и профилактических препаратов, отвечающих требованиям создавшейся ситуации.

Учитывая эти обстоятельства, нами разработаны рекомендации по проведению специальных ветеринарных мероприятий при организации оздоровительных противобруцеллезных работ.

В хозяйстве, специализированном по выращиванию крупного рогатого скота, проводят исследования на бруцеллез серологическими методами (РБП, РА, РСК). Реагирующих животных сдают на убой, оставшихся животных иммунизируют с целью ускоренного оздоровления препаратом для коррекции иммунного статуса организма (иммуностимулятором) по следующей схеме: животным вводят препарат подкожно в среднюю треть шеи в дозе 2–6 см³ в зависимости от живой массы 8-кратно с интервалом 7–10 сут. Между введениями препаратов (4–8) и спустя 15 сут. после последнего введения проводят серологические исследования на бруцеллез. При выделении положительно реагирующих животных их изолируют для последующего убоя. Далее исследуют вышеуказанными диагностическими методами животных до получения 2-кратного отрицательного результата. В случае необходимости (при угрозе заражения) отрицательно реагирующих на бруцеллез животных иммунизируют противобруцеллезной вакциной, создающей специфический иммунитет.

В хозяйстве, специализированном по выращиванию мелкого рогатого скота, исследуют на бруцеллез серологическими методами (РБП, РА, РСК). Реагирующих животных изолируют для убоя, оставшихся исследуют

систематически (ежемесячно) до получения отрицательных показаний на бруцеллез. В случае затруднения получения отрицательных результатов в кратчайшие сроки все поголовье иммунизируют препаратом в бешерстную область за локтевым суставом в дозе 1–2 см³ для коррекции иммунного статуса организма (иммуностимулятором) 4-кратно, с интервалом 7–10 сут. При необходимости введение иммуностимулятора повторяют еще 3–4 раза с интервалом 7–10 сут. При угрозе заражения отрицательно реагирующих на бруцеллез животных иммунизируют вакциной против бруцеллеза овец.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты, усиливающие резистентность животных, помогают организму противостоять вторжению инфекции, а комплекс, состоящий из препарата с антибиотиком и антигеном, повышает устойчивость животного к бруцеллезному агенту на 60–100 %.

Крупный и мелкий рогатый скот исследуют на бруцеллез серологическими методами (РБП, РА, РСК). Реагирующих животных изолируют для убоя, оставшихся исследуют систематически (ежемесячно) до получения отрицательных показаний на бруцеллез. В случае затруднения получения отрицательных результатов в кратчайшие сроки все поголовье иммунизируют препаратом для коррекции иммунного статуса организма (иммуностимулятором) 4-кратно, с интервалом 7–10 сут.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белобаб В.И. Пути совершенствования диагностики и профилактики бруцеллеза у животных: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – Алматы, 1998. – 52 с.
2. Белобаб В.И., Тен В.Б. Эффективность антибактериального препарата в борьбе с бруцеллезом с.-х. животных // Методы профилактики и диагностики бруцеллеза и туберкулеза с.-х. животных: сб. науч. тр. ВАСХНИЛ, ВНИИБТЖ. – Омск, 1991. – С. 87–91.
3. Иванов Н.П. Бруцеллез животных: методы и средства борьбы. – Алматы, 2002. – С. 250–251.
4. Тен В.Б. Методологические основы изготовления и совершенствования профилактических противобруцеллезных препаратов и диагностических средств: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – Алматы, 1996. – 45 с.
5. Тен В.Б., Мустафин Б.М., Мустафин М.К. Иммуномодуляторы при бруцеллезе животных // Теоретические и практические аспекты развития современной ветеринарной науки: сб. науч. тр. ТОО «КазНИВИ». – Алматы, 2012. – Т. LVIII. – С. 246–257.

УДК 619:616.98:578.824.11:615.371

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО БЕШЕНСТВУ В РОССИИ И АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКОЙ ВАКЦИНАЦИИ СРЕДИ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ, ВЫВОЗИМЫХ ЗА ГРАНИЦУ

Е.В. Чернышова¹, Н.А. Назаров², А.Е. Метлин³

¹ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chernishova@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В статье дана оценка эпизоотической ситуации по бешенству животных в России. Приведены результаты исследований уровней антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови животных, вывозимых за границу. Показана необходимость контроля эффективности антирабической вакцинации домашних животных.

Ключевые слова: бешенство, эпизоотическая ситуация, антирабические антитела, домашние животные, реакция нейтрализации в культуре клеток.

UDC 619:616.98:578.824.11:615.371

EPIZOOTIC SITUATION ON RABIES IN RUSSIA AND THE ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF ANTI-RABIES VACCINATION OF DOMESTIC ANIMALS WHICH ARE EXPORTED ABROAD

E.V. Chernyshova¹, N.A. Nazarov², A.E. Metlin³

¹ Leading veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chernishova@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The article assesses the epizootic situation of rabies animals in Russia. Results are available for research levels antirabies neutralizing antibodies in the sera of animals that are exported abroad. Shows the need for monitoring the effectiveness of anti-rabies vaccination of domestic animals.

Key words: rabies, epizootic situation, antirabies antibodies, pets, neutralization test in cell culture.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство остается одной из самых серьезных проблем как ветеринарии, так и здравоохранения. Бешенство в России эндемично на протяжении многих лет. Ежегодно выявляется значительное число случаев бешенства (рис. 1). По данным Информационно-

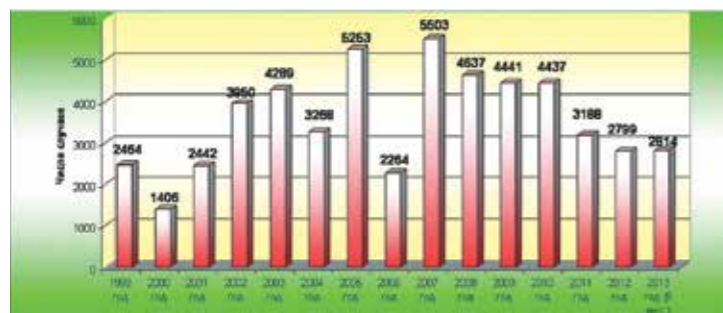


Рис. 1. Динамика изменения числа случаев бешенства животных в России за период с 1999 по 2013 гг. (данные за 6 месяцев)



Рис. 2. Географическое распространение бешенства в РФ

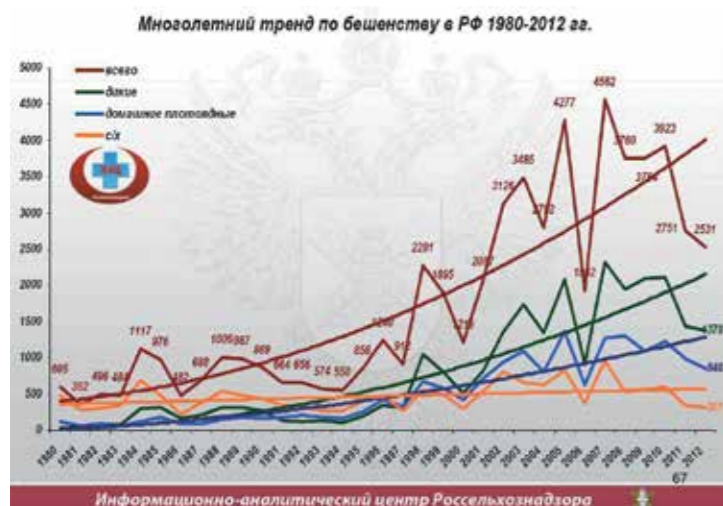


Рис. 3. Многолетний тренд по бешенству в РФ 1980–2012 гг. (по видам животных)

аналитического центра Россельхознадзора (http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2013/2013_1h.pdf), в 2009 г. заболевание регистрировалось во всех федеральных округах Российской Федерации. В общей сложности заболело и пало 4441 животное. За 2010 г. зарегистрировано 3923 неблагополучных пункта, заболело и пало 4437 голов; в 2011 г. – 2751 неблагополучный пункт, заболело и пало 3188 животных; в 2012 г. – 2531 неблагополучный пункт, заболело и пало 2799 животных. В I квартале 2013 г. выявлен 1821 неблагополучный пункт, где заболело и пало 2814 животных.

Географическое распространение бешенства на территории РФ представлено на рис. 2.

Наибольшее число неблагополучных пунктов (н.п.) за I полугодие 2013 г. зарегистрировано в Республике Татарстан (164 н.п.), Оренбургской (150 н.п.) и Челябинской областях (145 н.п.).

Как свидетельствует анализ данных за период наблюдения с 1980 г., заболеваемость среди сельскохозяйственных животных держится стабильно на неизменном уровне. Основной вклад в рост неблагополучия и заболеваемости вносят домашние и дикие плотоядные (рис. 3).

Как видно из рис. 3, кривая заболеваемости бешенством домашних животных повторяет кривую заболеваемости диких животных. Несмотря на то, что разделяют бешенство природного и городского типов, между ними поддерживается четкая взаимосвязь. Поэтому необходимо уделять должное внимание борьбе с бешенством не только в природной среде, но и в городской.

В последние годы для ввоза животных в страны Европы, Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока требуется не только наличие вакцинации против бешенства, но и сведения об уровне антирабических вируснейтрализующих антител. По данным МЭБ и ВОЗ, защитным уровнем антирабических вируснейтрализующих антител считается 0,5 МЕ/мл [3, 4].

С 2008 г. ФГБУ «ВНИИЗЖ» участвует в ежегодных международных квалификационных испытаниях по определению антирабических вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации в культуре клеток. Тестирование проводится Французским управлением по безопасности пищевых продуктов (ANSES). Организатором и координатором сравнительных испытаний является Справочная лаборатория ЕС по серологии бешенства, расположенная во Франции, в городе Нанси (Nancy).

По результатам сравнительных испытаний Справочная лаборатория выдает официальное заключение о результатах прохождения теста. Положительное заключение дает право лаборатории проводить официальные исследования по определению антирабических вируснейтрализующих антител у животных, результаты которых будут международно признаны.

Необходимо ежегодное подтверждение статуса лаборатории МЭБ.

ФГБУ «ВНИИЗЖ» успешно прошло тренировочный квалификационный тест в 2008 г. и официальные тесты в 2009–2013 гг., о чем указано в соответствующих подтверждающих документах.

Сведения о международной аккредитации ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAN»)) находятся по интернет-адресу:

http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/pets/approval_en.htm#russia.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сыворотки крови домашних животных исследовали в соответствии с «Методическими указаниями по



Таблица. Результаты определения уровней антирабических вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации в культуре клеток (FAVN) в сыворотках крови животных за 2011 – 9 месяцев 2013 гг.

Год	Количество проб	Кол-во положительных проб	% положительных проб
2011	7	7	100,0
2012	29	21	72,4
9 месяцев 2013	25	24	96,0
Всего	61	52	85,2

определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN), утвержденными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2011 г. [1].

В качестве референтных контролей использовали стандартную антирабическую и отрицательную сыворотки крови собак МЭБ.

Активность исследуемых сывороток рассчитывали по методу Спермана-Кербера [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием данной методики с 2011 по I полугодие 2013 гг. была исследована 61 проба сывороток крови от домашних и диких животных разных видов. Сыворотки крови животных были получены из 18 регионов Российской Федерации: Белгородской, Владимирской, Ивановской, Кемеровской, Ленинградской, Московской, Мурманской, Нижегородской, Новосибирской, Рязанской, Свердловской, Тульской, Тюменской, Ярославской областей, Краснодарского, Приморского, Ставропольского, Хабаровского краев – и Украины. В основном вывозят животных в Великобританию, Германию, Израиль, Канаду, Норвегию, ОАЭ, Южную Корею.

Как видно из таблицы, объем исследований, проводимых в ФГБУ «ВНИИЗЖ», имеет тенденцию к увеличению. Владельцам животных, у которых отсутствовал защитный уровень антител, рекомендовали пройти ревакцинацию.

Всего за весь период было исследовано 46 сывороток крови собак, 11 – кошек, 4 – лисицы, из них с защитным уровнем антител было 39, 9 и 4, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ситуация по бешенству животных в России остается напряженной. В связи с этим серьезное внимание необходимо уделять не только разработке мер борьбы с бешенством, но и контролю проводимых мероприятий.

В наших исследованиях процент животных с защитным уровнем антирабических антител среди собак составил 84,7%, среди кошек 81,8%, среди лисиц (из питомника) 100%. Это указывает на необходимость сочетания плановой вакцинации домашних животных с оценкой ее эффективности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN) / Е. В. Чернышова, Н. А. Назаров, А. Е. Метлин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир 2011. – 29 с.
2. Auberf M. F. A. Methods for the calculation of titres / W.A. Webster, G.A. Casey // Laboratory techniques in rabies. – 4th ed. – Geneva, 1996. – P. 445–459.
3. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Vol. 1 / OIE. – 6th ed. – Paris, 2008. – Chap. 2.1.13. – P. 304–323.
4. World Health Organization Expert Committee on Biological Standards. 35 Report. – Geneva: WHO, 1985. – World Health Organisation Technical Report. Series No. 725.

ПЕРВЫЕ ИТОГИ 55-го ГОДА ФГБУ «ВНИИЗЖ»



В октябре свой 55-летний юбилей отмечает подведомственный Россельхознадзору научно-исследовательский институт с более чем полувековой историей ФГБУ («ВНИИЗЖ») «Федеральный центр охраны здоровья животных». В предыдущих номерах мы писали подробно об истории Федерального центра и его становлении в качестве ведущего научно-исследовательского института. Однако заслуги сотрудников центра – это не только история, но и объективная реальность сегодняшних научных достижений. Подводя к юбилею предварительные итоги 2013 года, мы смело можем сказать, что этот год для Федерального центра стал успешным и знаковым. ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в очередной раз доказал свою значимость и авторитет на всероссийской и мировой «ветеринарной арене».

Январь. На базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» прошла серия семинаров Продовольственной и сельскохозяйственной Организации Объединенных Наций (ФАО) по вопросам распространения и борьбы с трансграничными болезнями животных в приграничных районах с участием главных ветеринарных инспекторов Китая, Монголии и России.

Апрель. Во ВНИИЗЖ состоялось специальное заседание Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ по вопросам профилактики ящура. В работе Совета принимали участие сотрудники Исполкома СНГ, главы ветеринарных служб государств – участников СНГ, в том числе руководство Россельхознадзора (заместитель руководителя Е.А. Непоклонов) и Департамента ветеринарии МСХ России (Л.М. Сургучева), представители Евразийской экономической комиссии, руководители и специалисты ветеринарных биопредприятий и ассоциаций. На заседании был детально рассмотрен и одобрен разработанный во ВНИИЗЖ «Проект Комплекса совместных мер государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром животных на период до 2020 года».

Июнь. При поддержке ФАО и Евразийской экономической комиссии во Владимире на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» прошел семинар-совещание по вопросам профилактики и искоренения ящура в странах Центрально-Азиатского региона.

Июнь-сентябрь. Изучение экзотических штаммов вируса ящура типа А, занесенных в 2013 году в нашу страну, с целью срочного использования их для производства эффективной вакцины (№2153, Забайкальский/13 и №2166/Краснодарский/13). Изготовление сорбированных вакцин для борьбы с ящуром.

Сентябрь. После проведения ФАО тщательной оценки основной деятельности подведомственного Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», а также учитывая его высокую репутацию в сфере науки, технологий и политики, институту присвоен статус «Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии». Новый международный статус возлагает на ФГБУ «ВНИИЗЖ» ряд функций и обязательств, основными из которых являются:

- предоставление услуг в качестве референтной лаборатории по ящуру в чрезвычайных ситуациях для стран – членов ФАО;
- обеспечение научно-технической поддержки стран, являющихся участниками «Дорожной карты Западной Евразии» в рамках «Пути поступательной борьбы с ящуром МЭБ/ФАО»;
- поддержка мониторинговых программ оценки поствакцинального иммунитета в странах региона.

Октябрь. Доказательством эффективного развития и использования в ветеринарной практике разработок ФГБУ «ВНИИЗЖ» становится вручение золотых медалей 15-й Российской агропромышленной выставки «Золотая осень 2013» в конкурсе «За разработку, производство и внедрение высокоэффективных ветеринарных препаратов, эффективное проведение противоэпизоотических мероприятий на территории субъекта Российской Федерации и ликвидацию заразных болезней животных». Медалями отмечены:

– вакцина против ящура универсальная сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21);

– вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21) (тип А, штамм – №2166 Краснодарский/13);

– вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21) (тип А, штамм – №2155 Забайкальский/13).

И это лишь часть мероприятий, проведенных в институте в этом году, не считая ежемесячных семинаров для ветеринарных специалистов России по профилактике и мерам борьбы с африканской чумой свиней, болезнями птиц, курсов повышения квалификации по инфекционным заболеваниям сельскохозяйственных животных.

Новые достижения совместно с имеющимися статусами института («Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья» и «Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру») позволяют с уверенностью говорить о значительном научном и производственном потенциале ФГБУ «ВНИИЗЖ».

к.в.н. Алексей Иголкин

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

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

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

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

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



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



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10-12-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 является подтверждением согласия автора на использование его произведения, как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник.

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

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

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

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

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

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

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

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

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

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)

Ветеринария сегодня – это прекрасная возможность заявить о себе миру!

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; <http://www.arriah.ru>