

ISSN 2304-196X

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

ВНИИЗЖ

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

ФЕВРАЛЬ №1 {8} 2014



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



Ветеринария сегодня №1 (8) 2014 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. лабораторией 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 17 февраля 2014 года

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 Международные статусы ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

• 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>

СОДЕРЖАНИЕ

- 5 В.В. Макаров, О.И. Сухарев, А.А. Стрижаков
Блютанг 8 в Европе: I. Эпизоотический и клинический паттерн
- 9 М.Р. Якупов
Использование рекомбинантных белков в серодиагностике АЧС (обзор)
- 16 В.Ю. Кулаков, Д.Б. Андрейчук, С.А. Похвальный, К.Ю. Федосеев
Биологические свойства слабовирулентного изолята вируса инфекционного ларинготрахеита птиц
- 27 Н.М. Авдеева, В.Г. Амелин, А.В. Третьяков
Одновременное извлечение восьми микотоксинов различных классов из зерна, кормов и их определение методом ВЭЖХ
- 35 В.В. Никифоров, Т.К. Майорова, А.К. Караулов, А.Н. Спиридонов, А.В. Саввин
Восприимчивость и роль диких животных при ящуре
- 41 А.С. Оганесян, А.К. Караулов, К.Н. Груздев, С.А. Дудников
Некоторые вопросы карантинирования хряков – доноров спермы
- 45 С.Г. Ремыга, О.Ю. Горюшев, А.А. Шевцов
Инактивация вируса гриппа свиной штамма «A/swine/California/07/09»
- 49 Н.М. Волкова, В.Г. Амелин, А.А. Тимофеев, А.В. Третьяков
Одновременное определение остаточных количеств сульфаниламидов и амфениколов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-ДМД

CONTENTS

- 5 V.V. Makarov, O.I. Sukharev, A.A. Strizhakov
Bluetongue 8 in Europe: I. Epidemic and clinical pattern
- 13 M.R. Yakupov
Use of recombinant proteins in ASF serodiagnosis (review)
- 22 V.Yu. Kulakov, D.B. Andreichuk, S.A. Pokhvalny, K.Yu. Fedoseyev
Biological properties of low virulent avian infectious laryngotracheitis virus isolate
- 31 N.M. Avdeeva, V.G. Amelin, A.V. Tretyakov
Simultaneous detection of eight mycotoxins of different classes from grain and feeds and their identification with the help of HPLC
- 35 V.V. Nikiforov, T.K. Mayorova, A.K. Karaulov, A.N. Spiridonov, A.V. Savvin
Susceptibility to foot and mouth disease and role of wild animals
- 41 A.S. Oganasyan, A.K. Karaulov, K.N. Gruzdev, S.A. Dudnikov
Some issues of semen donor-boars' quarantine
- 45 S.G. Remyga, O.Yu. Goryushev, A.A. Shevtsov
Inactivation of swine influenza virus strain «A/swine/California/07/09»
- 54 N.M. Volkova, V.G. Amelin, A.A. Timofeyev, A.V. Tretyakov
Simultaneous detection of sulfanilamide and amphenicol residues in food products by HPLC with diode-array detection

УДК 619:616.98:578.823.1

БЛЮТАНГ 8 СЕРОТИПА В ЕВРОПЕ:
I. ЭПИЗОТИЧЕСКИЙ И КЛИНИЧЕСКИЙ ПАТТЕРНВ.В. Макаров¹, О.И. Сухарев², А.А. Стрижаков³¹ доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, г. Москва, e-mail: vvm-39@mail.ru² доктор ветеринарных наук, Российский университет дружбы народов, г. Москва³ доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, г. Москва

РЕЗЮМЕ

В аналитической статье охарактеризованы эпизоотологические особенности эмерджентного распространения блютанга 8 серотипа в Северо-Западной Европе в 2006–2013 гг. Приведены основные показатели эпизоотического паттерна инфекции в условиях неэндемичной территории.

Ключевые слова: блютанг, неэндемичные территории, пути заноса.

UDC 619:616.98:578.823.1

BLUETONGUE – 8 IN EUROPE:
I. EPIDEMIC AND CLINICAL PATTERNV.V. Makarov¹, O.I. Sukharev², A.A. Strizhakov³¹ Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, vvm-39@mail.ru² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Peoples' Friendship University of Russia, Moscow³ Doctor of Science (Biology), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

SUMMARY

Epidemiological features of bluetongue serotype 8 spreading in the North-West Europe in 2006–2013 are characterized in the analytical paper. Major indicators of epidemic pattern of the infection in non-endemic territories are given.

Key words: bluetongue, non-endemic territories, routes of introduction.

ВВЕДЕНИЕ

Блютанг (БТ) – одна из наиболее опасных трансграничных инфекций животных. Эта природно-очаговая трансмиссивная вирусная катаральная лихорадка поражает жвачных многих видов, клинически протекает весьма злокачественно у овец с воспалительно-некротическими поражениями лицевой части, катаральным воспалением желудочно-кишечного тракта и коронитами. Зоной традиционного обитания мокрецов – переносчиков инфекции рода *Culicoides* (основной – афро-азиатский вид *C. imicola*) являются тропические и субтропические области между 35° южной и 40° северной широт. В рамках этого перизэкваториального пояса вирус БТ (ВБТ) 24 серотипов присутствует повсеместно (Африка, юг Азии, Австралия, Океания, Северная и Южная Америки), серотипы имеют самостоятельные и независимые ареалы распространения, однако заболеваемость приурочена в основном

к определенным эндемическим регионам (отдельные страны Африки, США) [2, 7].

До конца 20 в. Европа являлась северной границей ареала *C. imicola* и, соответственно, регистрируемой заболеваемости. Ближайшими эндемичными территориями были страны юго-западного, южного и юго-восточного Средиземноморья: Марокко, Алжир, Тунис, Турция, а также Ближний Восток. Спорадические случаи возникновения болезни отмечались на юге Испании и Португалии (1956–1960 гг.), на островах Греции, Кипре, в Болгарии (1979–1980 гг.) (все в пределах обитания *C. imicola*) [5, 7].

Основательное вторжение БТ в Европу началось в 1998 г. В последующий период, до 2006 г., заболевание распространилось севернее обычных границ зооареала на 800 км в параллелиально расположенных Сицилии, Сардинии, материковой Италии и далее, от атлантического побережья до Балканского региона, всего в 14 странах северного Средиземноморья, где выявлены шесть серотипов вируса: 1, 2, 4, 9, 15 и 16. Крупные эпизоотические вспышки и эпизоотии привели к потерям миллионов овец. Вместе с тем отмечены важные особенности эпизоотических паттернов: заболеваемость нередко возникала в зонах отсутствия *C. imicola* (свидетельство векторной способности мокрецов местных видов), течение инфекции варьировало в разных вспышках, наибольшая тяжесть отмечена в странах восточного Средиземноморья (Албания,

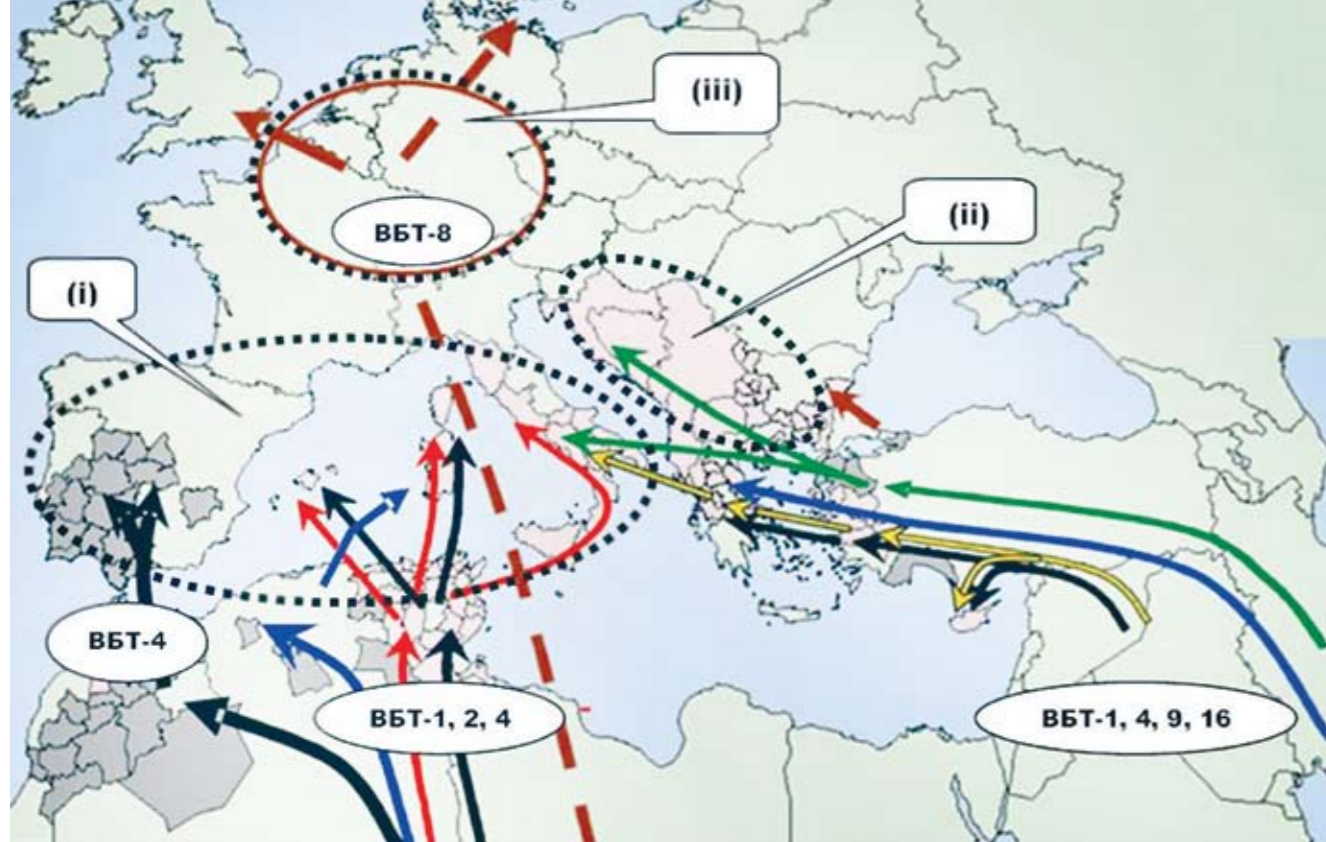


Рис. 1. Пути и направления заноса блютанга в Европу, серотиповая эпизоотология, новые эпистеммы и кластеры (отмечены черным пунктиром) [9]

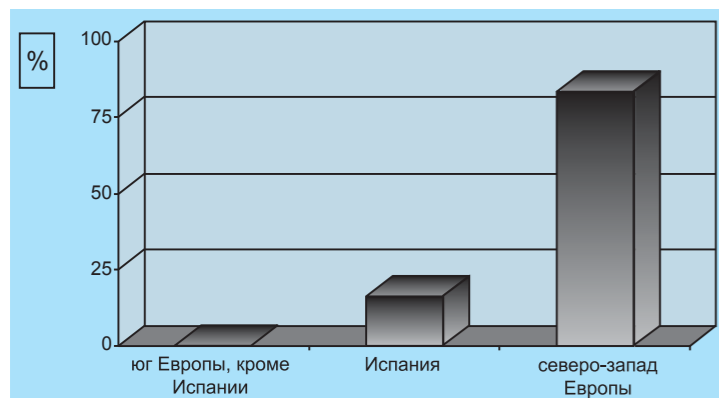


Рис. 2. Превалентность блютанга в Европе в 2006–2008 гг. (% неблагополучных стад, n 50797) [по данным WAHID]

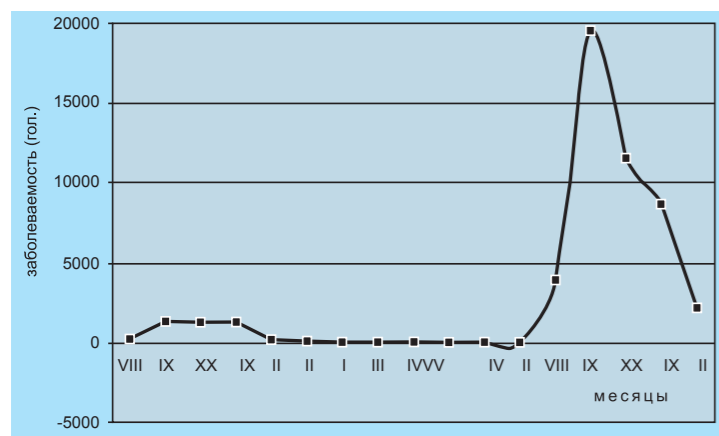


Рис. 3. Сезонность БТ-8 в Европе с августа 2006 г. по декабрь 2007 г. [по данным WAHID]

Болгария, Греция, Хорватия и др.), не было случаев выраженной клинической картины заболевания у КРС [2, 3, 7, 9].

С 2006 г. началось эмерджентное преобладающее распространение БТ в совершенно неожиданном регионе северо-запада Европы после заноса вируса 8 серотипа, нового для континента, из глубины Африки. Цель настоящей работы – анализ эпизоотологических особенностей БТ в условиях неэндемичной территории в 2006–2012 гг., выявление и сравнительная характеристика основных показателей эпизоотического паттерна инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в формате систематического обзора, объектом которого явились статистические данные, результаты оригинальных работ и первичных публикаций по нозогеографии, эпизоотологии БТ, экологии переносчиков рода *Culicoides* и иным вопросам в контексте поставленной цели. Поиск доказательной информации осуществлен в отобранных базах данных (ProMED, WAHID, EMPRES, OIE Publications) и научных изданиях (все источники доступны в World Wide Web, основные приведены в списке источников). В целях статистического обобщения данных, включенных в систематический обзор, использован качественный и количественный мета-анализ – научно-систематический прием, позволяющий объединить результаты независимых исследований [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С августа 2006 г. в Северо-Западной Европе начались крупные эпизоотические вспышки БТ африканского серотипа 8 (ВБТ-8), который ранее регистрировался в субсахарной Африке (Кения, Нигерия) и внезапно появился на новой территории, минуя ставшую неблагополучной до этого южную Европу. ВБТ-8 успешно «перезимовал» в районе 53° северной широты, заболевание в 2007 г. быстро распространялось в Бельгии, Голландии, Германии, Франции (40 000 неблагополучных пунктов), затем в Чехии, Венгрии, Швеции, Швейцарии, Великобритании [5, 8, 9].

Анализ вторжения серотипов ВБТ на неэндемичные территории Европы с 1998 г., подробно представленный на рисунке 1, позволяет выявить десять путей проникновения инфекции из афро-азиатских нозоареалов (показаны стрелками) по четырем направлениям:

- западному, с крайнего северо-запада Африки (Марокко и Алжир);
- центральному, с севера Африки (Тунис);
- восточному, с Ближнего Востока через Турцию;
- центральному, из глубины континента (субсахарная Африка), реализованному позднее, в 2006 г.

Таким образом, в Европе сложились две пространственно-временные и типологические эпистеммы БТ: в 1998–2005 гг. южно-европейская с двумя территориальными кластерами: юго-западным (i), где идентифицированы серотипы вируса 1, 2, 4, имеющие происхождение из стран южного Средиземноморья, и юго-восточным (ii), с серотипами вируса 1, 4, 9, 16 из регионов Ближнего, Среднего, Дальнего Востока, и, с 2006 г., северо-западная (iii) – серотип вируса 8 из центра Африки (отмечены на рисунке 1).

Беспрецедентное распространение БТ-8 в новом неэндемичном регионе Европы вслед за эпизоотиями на юге континента в рамках своеобразной инфекционной эпистеммы, значительно продвинутой на север в меридиональном направлении (до 60° и далее), сопровождалось высокой заболеваемостью, потенциальным вовлечением миллионов восприимчивых животных и новых, автохтонных палеарктических видов переносчиков рода *Culicoides* (комплексы *C. obsoletus*, *C. pulicaris* и др.) [2, 7, 8].

В течение 2006–2008 гг. преимущественная превалентность БТ сместилась на северо-запад Европы (< 80 % заболеваемости), на юге континента произошло угасание эпизоотий (рисунок 2).

Начиная с первой регистрации ВБТ-8 в августе 2006 г., динамика месячной заболеваемости характеризовалась первичной сезонной волной небольшой интенсивности по декабрь (около 4 000 случаев) и вторичным сезонным пиком в тот же внутригодовой период следующего 2007 г. уже с максимальным, десятикратно возросшим уровнем (рисунок 3), в полном соответствии с канонами учения о природноочаговых процессах Е.Н. Павловского.

В целом эпизоотические показатели характеризовали значительный масштаб новой, северо-западной эпистеммы БТ-8 и существенные отличия вызываемой им патологии. За семилетний период эпизоотии на северо-западе Европы заболеваемость восприимчивых животных разных видов превысила 80 000 гол., смертность в группах риска составляла 3–5%. Особо тяжелое, злокачественное течение болезни отмечено у овец и коз (летальность около 30 и 60 %, соответственно).

Настораживающей явилась повышенная вирулентность ВБТ-8 для КРС – основного паразитосистемного хозяина – по сравнению с предшествующей эпизоотической ситуацией 1998–2008 гг. на юге Европы с участием других шести серотипов вируса, где эти животные в случае инфицирования не демонстрировали существенных клинических признаков (рисунки 4, 5 и 6). Клинический профиль практически не отличался от такового у овец, летальность БТ-8 для КРС составила 4 %, абсолютные потери – около 1 500 гол. Только во французской зоне неблагополучия по БТ-8 отход КРС увеличился на 25 %. Вирус был способен преодолевать плацентарный барьер и инфицировать плод [3, 6].

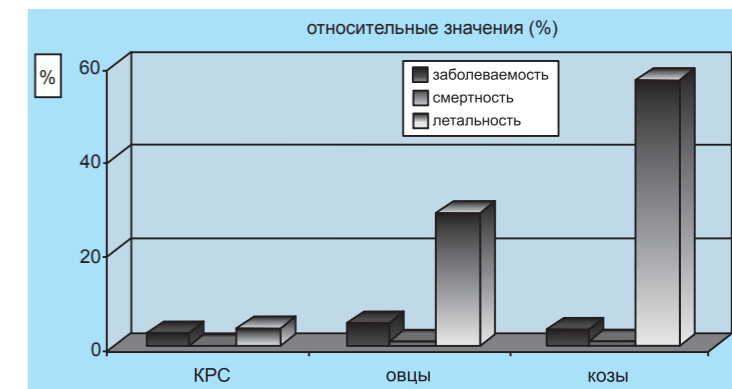
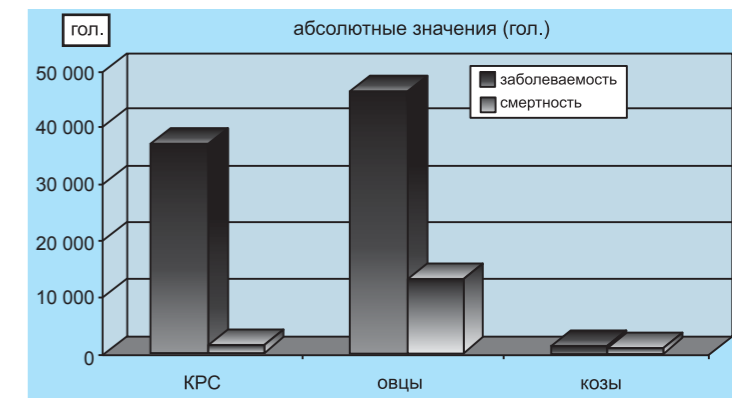


Рис. 4. Блютанг 8 серотипа в Северо-Западной Европе в 2006–2012 гг.: эпизоотические показатели интенсивности [по данным WAHID]

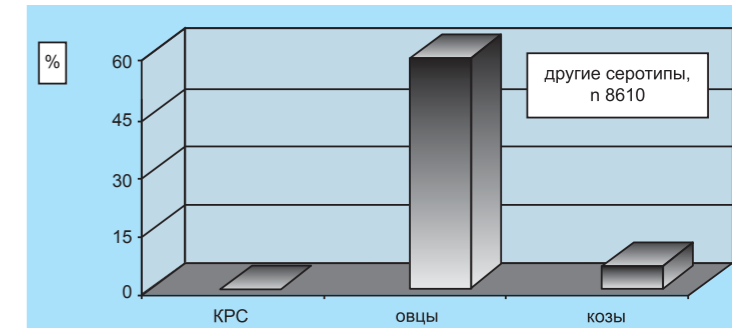
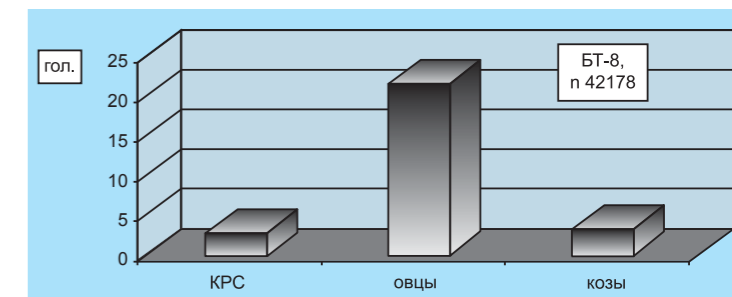


Рис. 5. Сравнительная тяжесть влияния на популяции восприимчивых животных (смертность) блютанга 8 серотипа в Европе (% неблагополучных стад с летальными случаями в 2006–2008 гг.) [по данным WAHID]

В ходе эксплозивного развития эпизоотической ситуации БТ-8 в период 2006–2012 гг. пик интенсивности пришелся на 2007–2008 гг., когда годовые показатели – число вспышек и общая заболеваемость – приближались к 10 тысячам и достигали 35 тысяч, соответственно. В качестве противодействия неблагополучные страны экстренно реализовали комплексные противоэпизоотические программы, включающие

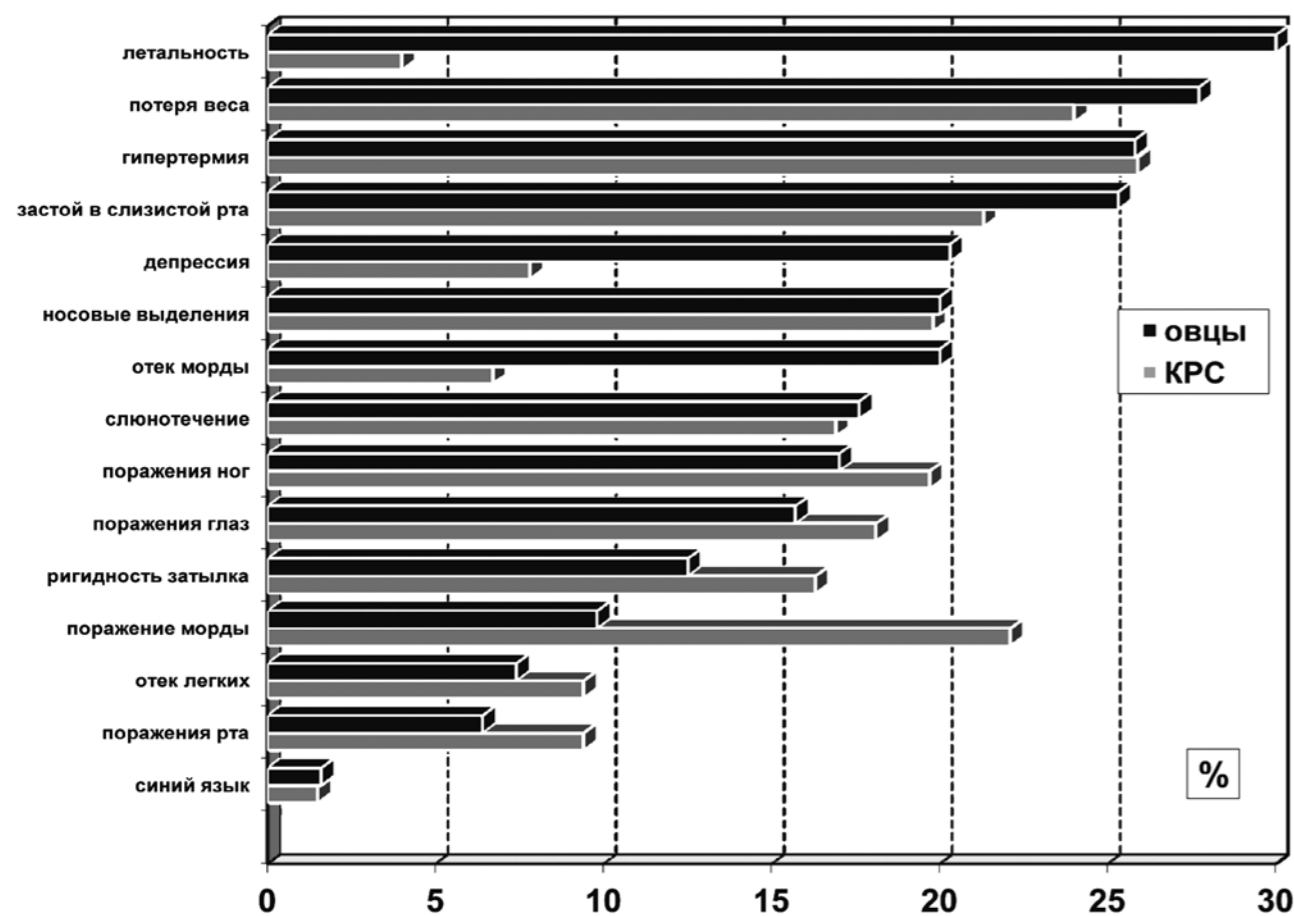


Рис. 6. Блютанг 8 серотипа в Северо-Западной Европе: клинический профиль у овец и КРС [4]

Ольге Орловой, Анатолию Серганову за помощь в сборе и подготовке материалов по теме.

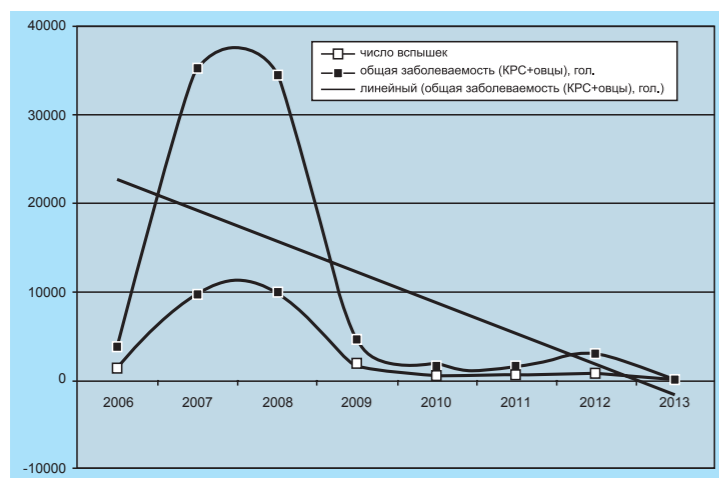


Рис. 7. Блютанг 8 серотипа в Северо-Западной Европе: динамика семилетней эпизоотии и тренд [по данным WANID]

контроль вектора и тотальную вакцинацию восприимчивых животных [3, 6]. В 2009 г. значения показателей сократились на 80 % и более, прогрессивное снижение продолжилось и далее, в 2013 г. БТ-8 на северо-западе Европы не регистрировался (рисунок 7).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность студентам ветеринарного отделения Российского университета дружбы народов Екатерине Шадской, Ксении Казерской, Екатерине Дубровиной, Ольге Колесниковой,

УДК 619:616.98:578.842.1:616-078

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ АЧС (ОБЗОР)

М.Р. Якупов

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

РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по использованию рекомбинантных белков вируса африканской чумы свиней в качестве антигена в твердофазном иммуноферментном анализе. Проанализированы результаты исследований наиболее перспективных рекомбинантных белков. Показаны преимущества использования таких белков в серодиагностике африканской чумы свиней.

Ключевые слова: африканская чума свиней, рекомбинантные белки, твердофазный иммуноферментный анализ, специфические антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – острое контагиозное заболевание, поражающее свиней всех возрастных групп и пород. АЧС характеризуется лихорадкой, геморрагическим диатезом, воспалительными и некродистрофическими изменениями паренхиматозных органов и кожных покровов. Протекает остро, подостро, хронически и бессимптомно [1]. Возбудитель АЧС – крупный (диаметром 175–215 нм) оболочечный ДНК-содержащий вирус с икосаэдральной симметрией капсида.

Вирус АЧС – единственный представитель семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. Размер двухцепочечной ДНК варьирует от 170 до 190 тысяч пар нуклеотидов. Репликация вируса происходит в цитоплазме клеток, хотя синтез ДНК возбудителя осуществляется в ядре [8].

Важнейшим его свойством, которое определяет его способность длительно сохраняться в окружающей среде, является выраженная устойчивость к неблагоприятным воздействиям широких колебаний температуры и pH среды. Особую роль в распространении АЧС играет способность вируса сохранять инфекционные свойства в продуктах свиного происхождения. Проникновение вируса АЧС в организм не сопровождается образованием вируснейтрализующих антител, вследствие чего разработка средств специфической профилактики болезни проблематична.

Мероприятия по борьбе с АЧС основаны на быстрой диагностике болезни, уничтожении всех свиней в эпизоотическом очаге и проведении жестких ветеринарно-санитарных мер в первой и второй угрожаемых зонах.

Одним из первых серологических анализов, используемых для лабораторной диагностики АЧС, был встречный иммуноэлектрофорез. Этот анализ был гораздо более чувствительным, чем тест двойной диффузной преципитации в агарозном геле, и даже более чувствительным, чем метод связывания комплемента, и вскоре стал применяться в качестве скрининг-теста. Антиген, используемый в иммуноэлектрофорезе, получали из экстрактов клеток Vero, инфицированных вирусом АЧС. Тем не менее, при инфекционных заболеваниях, где диагноз основывается на определении антител, требуется подтверждающий тест для проверки положительных результатов. В связи с этим стратегия серодиагностики АЧС в прошлом использовала иммуноэлектрофорез в качестве скрининг-теста, а реакцию непрямой иммунофлюоресценции для подтверждения положительных результатов. Хотя эти методы сыграли важную роль в серологической диагностике АЧС, они являются весьма трудоемкими, что делает затруднительным их использование для крупномасштабных исследований. Таким образом, данный анализ вскоре был заменен методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА), который считается наиболее чувствительным и подходящим для тестирования большого количества сывороток. Хотя метод ТФ ИФА и обладает более высокой чувствительностью, чем метод иммуноэлектрофореза, в обоих анализах качество подготовки антигена влияет на конечную чувствительность и специфичность теста.

Что касается выделения вируса с использованием восприимчивых животных и культур клеток, то эти методы весьма трудоемки и требуют специально оборудованных помещений, имеющих определенный уровень защиты для работы с возбудителями особо опасных инфекций, а также являются весьма затратными методами.

Данные факторы обуславливают необходимость совершенствования методов диагностики, а также требуют оптимизации ветеринарно-санитарных мероприятий при обнаружении вспышек болезни и ее ликвидации [3].

Актуальной задачей совершенствования серодиагностических методов является необходимость определения наиболее перспективных вирусных белков, обладающих высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и достаточным количеством антигенных детерминант.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ АЧС

Всего вирус АЧС содержит 34 структурных белка и около 100 неструктурных, которые были идентифицированы в макрофагах, зараженных вирусом АЧС животных. Около 50 из них обладают антигенными свойствами и вызывают выработку специфических антител при инфицировании восприимчивых животных данным возбудителем. Белки р72, р54 и р12 участвуют в прикреплении вируса к клетке и являются высокоантигенными. Белок р32 участвует в проникновении вируса в клетку. Все вышеуказанные белки с успехом могут быть использованы в серологической диагностике.

В настоящее время в исследовании различных белков вируса АЧС удалось достичь некоторых успехов. Достигнутый прогресс в этой области поможет в дальнейшем повлиять на разработку более точных и надежных серологических тестов для диагностики АЧС.

В свою очередь решающее значение здесь принадлежит знанию белкового состава вируса АЧС и структуры вириона.

Несмотря на чувствительность метода ТФ ИФА, одним из его недостатков продолжает оставаться возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Следовательно, положительные образцы сывороток требуют подтверждения своего статуса с помощью других методов. Ранее для этого применялся метод непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) [9], затем он был заменен на иммуноблоттинг, который обеспечивает высокую специфичность и чувствительность, сходную с данными характеристиками в реакции ИФА. Кроме того, иммуноблоттинг позволяет с большей точностью обнаруживать антитела в плохо сохранившихся сыворотках [7] и обеспечивает простую и объективную интерпретацию результатов [11, 12].

Один из вирусных белков, ответственных за индукцию антител в результате естественной инфекции, – белок р72, который является основным компонентом вирусного капсида [18].

Белки р30 и р54 были определены как высокоантигенные [6, 10, 11, 14, 15, 16].

Белком-предшественником зрелых структурных белков р35 и р15 является полипротеин РР62, локализованный в ядре оболочки [4]. Полипротеин РР62 сохраняется длительное время в сыворотках от АЧС-инфицированных свиней, в то время как меньшее количество было обнаружено в отношении белков р30 и р54 [6]. Эти результаты могут указывать на то, что антитела против РР62 являются более стабильными, чем антитела против других белков.

Есть данные об аналитическом исследовании 12 рекомбинантных белков, которые проявили антигенную активность: трех неструктурных (F334L, K196R и NP419L), четырех уже известных ранее белков (B602L,

C44L, Cp312R и K205R), трех структурных белков, выявленных давно, р30 (CP204L), P54 (E183L) и р72 (B646L), и двух бактериальных гистонов – подобных белков A104 R и P10 (K78R). Анализ проводился с использованием сывороток, отобранных от экспериментально зараженных свиней. Наиболее высокие титры антител были подтверждены в отношении 4 из 12 исследуемых белков: р54, K205R, A104R и B602L [21]. Через два года подтвердили антигенность этих рекомбинантных белков путем тестирования на сыворотках от свиней, естественно инфицированных АЧС [13]. Сравнивали их активность в иммуноферментном анализе с активностью в иммуноблоттинге – «золотым стандартом», утвержденным МЭБ. Работа проводилась с образцами сывороток, отобранных от животных в странах Европы, а также с образцами сывороток из Западной и Восточной Африки. Следует отметить, что результаты, полученные при анализе большой коллекции образцов сывороток крови от восприимчивых животных из Европы и Африки, были сопоставимы с результатами, полученными с помощью наборов ТФ ИФА, рекомендованных МЭБ.

Для того чтобы оценить применимость данных рекомбинантных белков в ИФА, 39 образцов сывороток, ранее классифицированных как положительные на АЧС, в испытаниях, утвержденных МЭБ, выдерживали при 37 °С в течение 1 месяца. Затем на этих сыворотках в ИФА проверялся каждый белок. Результаты были сопоставлены с данными необработанных сывороток, и была установлена переменная потеря реактивности, в зависимости от того, какой рекомбинантный белок был использован. Несмотря на то, что с помощью рA104R-ELISA были получены неудовлетворительные результаты, большинство ранее положительных сывороток после термической обработки остались положительными с белками р54 и рB602L-ELISA. При суммарном обобщении результатов на основании всех трех белков (р54-, рB602L- и рK205R-ИФА), из 39 термообработанных положительных образцов только одна сыворотка показала отрицательный результат. Чувствительность в данном исследовании составила 95 % для р54-ИФА, 87 % – для рB602L-ИФА, 80 % – для рK205R-ИФА и 31 % – для рA104R-ИФА. В то время как чувствительность набора ТФ ИФА, рекомендованного МЭБ, составила 87 % [19].

Для проверки чувствительности метода с полевыми сыворотками были исследованы положительные на АЧС образцы сывороток крови свиней из Западной Африки. Метод ТФ ИФА на основе описанных выше четырех рекомбинантных белков вируса АЧС показал высокую чувствительность, ложные результаты отсутствовали.

Учитывая данные анализа образцов сывороток крови, полученных от свиней из Восточной Африки, можно отметить низкую чувствительность, но высокую специфичность в ИФА. Объяснить полученные результаты можно большим генотипическим разнообразием изолятов вируса АЧС.

В итоге при обобщении всех данных сделано заключение, что в отличие от Западной Африки и Европы, где данные белки можно с успехом внедрять в диагностическую практику, использование тестируемых белков нецелесообразно для диагностики АЧС в сыворотках крови свиней из Восточной Африки [19].

В 2011 г. по результатам исследования специалистов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии опубликована статья, которая была посвящена анализу эффектив-

ности применения рекомбинантных белков р30 и р72 вируса АЧС [2]. Предметом изучения была выработка антител к вирусу АЧС при различных формах течения болезни, а также их уровень в сыворотках крови животных при остром и хроническом течении болезни методом ТФ ИФА. Испытания рекомбинантных белков р30 и р72 в качестве диагностических антигенов показали их специфичность при выявлении антител в референс-сыворотках крови свиней к вирусу АЧС I, II, III, IV серотипов. Для изучения начальных этапов процесса антителообразования у свиней, инфицированных высоковирулентными изолятами вируса АЧС, проводили парентеральное заражение подсосунков. Через 5–10 сут. от павших животных отбирали кровь и селезенку и исследовали на наличие антител к белкам р72 и р30 вируса АЧС методом непрямого ТФ ИФА. В результате было установлено, что использование данных белков позволяет выявить антитела в селезенке на 5 сут., а в крови – на 7 сут. после заражения. С увеличением периода с момента заражения происходит увеличение титра специфических антител в крови, а в селезенке уменьшается. Для более точного анализа проводились испытания с заражением низковирулентными изолятами вируса и дальнейшим исследованием крови по той же схеме. Было показано, что использование рекомбинантного р30 и смеси его с рекомбинантным р72 увеличивало чувствительность реакции в 4–8 раз по сравнению с рекомбинантным р72 отдельно и по сравнению с использованием специфического культурального антигена. Следовательно, для анализа сывороток на наличие специфических антител к вирусу АЧС использование смеси рекомбинантных белков р30 и р72 позволяет повысить чувствительность и специфичность метода непрямого ТФ ИФА [2].

J. M. Oviedo, F. Rodriguez и др. провели анализ сравнения последовательностей генов E183L и CP204L, кодирующих белки р54 и р30, соответственно, у разных полевых изолятов и штаммов вируса, которые были выделены с различных территорий в разное время. Эксперименты по использованию белков р54 и р30 в качестве антигена в ТФ ИФА и иммуноблоттинге указывают на возможность использования в качестве антигена белок р30 в ИФА, в то время как р54 предпочтителен как антиген вируса АЧС для обнаружения антител в иммуноблоттинге [14].

Примечательно, что полученные результаты коррелируют с данными M. G. Barderasa, A. Wigdorovitz и др. (2000) о целесообразности использования белка р30 вируса АЧС в качестве антигена для ИФА при серологической диагностике данного заболевания [20].

C. Cubillo, S. Gómez-Sebastian и др. анализировали и тестировали рекомбинантные белки на сыворотках крови свиней из различных стран и континентов. Результаты тестирования сывороток свиней из Африки показывают, что применение белка р30г, штамма Morara/Georgia в ТФ ИФА обеспечивает специфичность около 98 %, независимо от происхождения сыворотки (Восточная, Центральная или Западная Африка), при этом чувствительность варьировала от 90 % (Западная Африка) до 100 % (Восточная Африка). Это, вероятно, связано с высокой генетической изменчивостью изолятов вируса АЧС [5]. Тем не менее, различия в чувствительности были значительно ниже, чем описано ранее в работах D. M. Pérez-Filgueira и др. о применении белка р30г, штамма E70, который обеспечил чувствительность 70 % и 100 % для образцов из

Восточной и Западной Африки, соответственно. Таким образом, можно заключить, что использование белка р30г штамма Morara/Georgia в ТФ ИФА обеспечивает достаточно высокую специфичность (97–98 %) и чувствительность (90–100 %) метода для серодиагностики АЧС в юго-восточных (Мозамбик), центральных (ДРК) и западных (Сенегал) африканских странах. Сделано предположение, что сочетание белков р30г штаммов E70 и Morara/Georgia обеспечит универсальный тест ТФ ИФА для диагностики АЧС [17].

Таким образом, в сообщении описывается доступный и недорогой серологический тест, использование которого позволит точно определить наличие антител против вируса АЧС, независимо от географического происхождения испытуемой сыворотки [5].

ОБСУЖДЕНИЕ

Классические анализы, такие как ТФ ИФА или иммуноблоттинг, основанные на использовании экстракта инфицированных вирусом АЧС клеток, успешно применяют для диагностики подострой и бессимптомной формы заболевания, но присутствует ряд недостатков, в основном связанных с биологической опасностью, сложностью диагностической интерпретации и проблемой стандартизации.

Многочисленные исследования показывают необходимость применения рекомбинантных белков в серодиагностике АЧС, так как в связи с отсутствием средств специфической профилактики проблема совершенствования методов диагностики данного заболевания актуальна. Наука в области рекомбинантных технологий прогрессирует, а международное сотрудничество в современном мире позволяет обмениваться опытом и создавать качественные и надежные тесты для использования во всем мире.

Использование рекомбинантных белков для диагностики имеет следующие преимущества по сравнению с методами, базирующимися на использовании антигена из экстракта инфицированных клеток:

- 1) исключается использование живого вируса для получения антигена, что является потенциальной опасностью;
- 2) рекомбинантный антиген не содержит компонентов культур клеток, что повышает чистоту антигена;
- 3) отпадает необходимость инактивации вируса, что сохраняет нативными конформационные эпитопы антигена;
- 4) позволяет стандартизировать антиген, что улучшает однородность результатов, полученных в разных лабораториях.

ВЫВОДЫ

Зарубежная практика исследований сывороток крови свиней на наличие специфических антител к вирусу АЧС доказала эффективность и целесообразность использования рекомбинантных белков.

Доступность клонирования и экспрессии генов, кодирующих необходимые белки, доказана как зарубежной, так и отечественной практикой. Наличие различных способов получения рекомбинантных белков дает возможность выбора наиболее удобного, максимально продуктивного и качественного для конкретной лаборатории.

Таким образом, выявление наличия антител в сыворотке с использованием рекомбинантных белков – воспроизводимая и безопасная альтернатива традиционным методам, позволяющая стандартизировать

антиген в производстве, устраняя необходимость манипулирования инфекционным материалом. Исследования, посвященные использованию рекомбинантных белков вируса АЧС для серологической диагностики, показали многообещающие результаты. Кроме того, эти белки имеют дополнительные преимущества, они упрощают интерпретацию тестов, повышают воспроизводимость анализов, а также обеспечивают высокую чувствительность при исследовании плохо сохранившихся образцов сывороток.

Эти данные еще раз подтверждают целесообразность использования рекомбинантных белков вируса АЧС для диагностики данного заболевания, в частности, для выявления специфических антител различными вариантами ИФА. При различных формах течения болезни и на разных стадиях заболевания применение методов ИФА на основе рекомбинантных антигенов стабильно обеспечивает достоверность результатов с высоким уровнем специфичности и чувствительности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.А. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
2. Рекомбинантные белки в изучении африканской чумы свиней / А.С. Казакова, Т.Э. Южук, Ю.Ф. Калантаенко [и др.] // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – №67(03).
3. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence / C.L. Afonso, L. Zsak, C. Carrillo [et al.] // J. Gen. Virol. – 1998. – Vol. 79, № 1. – P. 2543–2547.
4. African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell / G. Andrés, A. Alejo, J. Salas, M.L. Salas // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76. – P. 12473–12482.
5. African swine fever virus serodiagnosis: A general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gómez-Sebastian, N. Moreno [et al.] // Virus Research. – 2013. – URL: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SEROLOGA_CISA.pdf.
6. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus pro-teín pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodríguez [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44. – P. 950–956.
7. Arias M., Escribano J.M., Sánchez-Vizcaino J.M. Persistence of African swine fever antibody reactivity on ELISA and immunoblotting assays // Veterinary Record. – 1993. – Vol. 133. – P. 189–190.
8. Asfarviridae / L.K. Dixon, C. Alonso, J.M. Escribano [et al.] // Virus Taxonomy / ed. M.Q. Andrew [et al.]. – Oxford, 2011. – P. 153–162.
9. Botija C.S. Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence // Bulletin de l'Office International des Epizooties. – 1970. – Vol. 73 – P. 1025–1044.
10. Characterization of p30, a highly antigenic

membrane and secreted protein of African swine fever virus / C.L. Afonso, C. Alcaraz, A. Brun [et al.] // Virology. – 1992. – Vol. 189. – P. 368–373.

11. Comparison of a radioimmuno-precipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus / C. Alcaraz, M. De Diego, M.J. Pastor, J.M. Escribano // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1990. – Vol. 2. – P. 191–196.

12. Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay / M.J. Pastor, M.D. Laviada, J.M. Sanchez-Vizcaino, J.M. Escribano // Canadian Journal of Veterinary Research. – 1989. – Vol. 53. – P. 105–107.

13. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes / C. Gallardo, M.M. Dufton, J.M. Macharia [et al.] // Virus Genes. – 2009. – Vol. 38. – P. 85–95.

14. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodriguez, P. Gómez-Puertas [et al.] // Journal of Virological Methods. – 1997. – Vol. 64, № 1. – P. 27–35.

15. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C. Alcaraz, F. Rodriguez, J.M. Oviedo [et al.] // Journal of Virological Methods. – 1995. – Vol. 52. – P. 111–119.

16. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody / S.D. Kollnberger, B. Gutierrez-Castaneda, M. Foster-Cuevas [et al.] // Journal of General Virology. – 2002. – Vol. 83. – P. 1331–1342.

17. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae / D.M. Pérez-Filgueira, F. González-Camacho, C. Gallardo [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44. – P. 3114–3121.

18. Proteins specified by African swine fever virus. II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties / E. Tabarés, J. Martínez, F. Ruiz Gonzalvo, C. Sánchez-Botija // Archives of Virology. – 1980. – Vol. 66 (2). – P. 119–132.

19. Recombinant Antigen Targets for Serodiagnosis of African Swine Fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalema-Zikusoka [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2009. – Vol. 16 (7). – P. 1012–1020.

20. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M.G. Barderas, A. Wigdorovitz, F. Mereloc [et al.] // Journal of Virol. Methods. – 2000. – Vol. 89, № 1–2. – P. 129–136.

21. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penedos [et al.] // Journal of General Virology. 2007. – Vol. 88. – P. 2426–2434.

USE OF RECOMBINANT PROTEINS IN ASF SERODIAGNOSIS (REVIEW)

M.R. Yakupov

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

SUMMARY

The paper presents data on using recombinant African swine fever virus proteins as an antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of studies of prospective recombinant proteins were reviewed. Advantages of using such proteins for ASF serologic diagnosis are described.

Key words: African swine fever, recombinant proteins, enzyme-linked immunosorbent assay, specific antibodies.

INTRODUCTION

African swine fever is an acute contagious disease affecting pigs of all ages and breeds. ASF is characterized with fever, hemorrhagic diathesis, inflammatory and necrotic and dystrophic changes of parenchymatous organs and skin. The disease occurs in acute, subacute, chronic and asymptomatic forms [1]. ASF agent is a large (175-215 nm) enveloped DNA virus with an icosahedral symmetry of the capsid.

The ASF virus is the only representative of *Asfarviridae* family of *Asfivirus* genus. The size of the double-stranded DNA varies between 170 and 190 kb. The virus replicates in the cellular cytoplasm, though the agent DNA synthesis occurs in the nucleus [8].

The most important property of the agent predetermining its ability to be maintained in the environment for a long time is its marked resistance to adverse effects of wide fluctuations of temperature and pH of the environment. The virus ability to preserve its infectivity in porcine products plays a key role in ASF spread. ASF virus does not induce the production of virus-neutralizing antibodies which makes the development of products for specific prevention of the disease quite challenging.

Measures for ASF control are based on the rapid disease diagnosis, destruction of all pigs in an epidemic focus and implementing stringent animal health measures in the first and second risk zones.

One of the first serologic tests used for ASF diagnosis was immunoelectroosmophoresis (IEOP). This assay was much more sensitive than agar gel double-diffusion precipitation test and even more sensitive than complement fixation test and soon was established as a screening test. The antigen used for IEOP was produced from ASF infected Vero cell extracts. Nevertheless, in infectious diseases where the diagnosis is based on antibody determination confirmatory tests are usually required to confirm positive results. In this respect ASF diagnostic strategy was previously based on IEOP as a screening test and on indirect fluorescence test as a confirmatory test. Though these methods played an important role in ASF serologic diagnosis they were rather labour-consuming that hindered their use for large-scale surveys. Thus the IEOP assay test was soon replaced by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which is now

considered the most sensitive and appropriate for testing large quantities of sera. While ELISA is more sensitive than IEOP, the final sensitivity and specificity of both assays depend on the quality of antigen preparation.

As regards the virus isolation using susceptible animals and cell cultures, these methods are also very labour-intensive and require specially equipped facilities having the appropriate level of containment for handling agents of highly dangerous infections. They are also quite expensive.

These factors stipulate the need for improving diagnostic methods and optimizing animal health measures in case of the disease outbreak detection and eradication [3].

The critical task for improving serodiagnostic methods is to identify the most prospective virus proteins characterized by high antigenicity, optimum packing density and sufficient number of antigenic determinates.

RECOMBINANT PROTEINS IN ASF SERODIAGNOSIS

ASF virus comprises a total of 34 structural proteins and about 100 non-structural proteins which were identified in ASFV-infected macrophages. About 50 of them possess antigenic properties and induce production of specific antibodies in susceptible animals infected with this agent. Proteins p72, p54 and p12 are involved in the virus binding to the cell and are highly antigenic. Protein p32 is involved in the virus penetration in the cell. All the abovementioned proteins can be successfully used in serodiagnosis.

Recent studies of different ASF virus proteins have had some effect. The achieved progress in this field will help to develop more accurate and valid serologic tests for ASF diagnosis.

Knowledge of the protein composition of ASFV virion structures is crucial.

Despite the sensitivity of ELISA one of its limitations is still the feasibility of false positive and false negative results. Therefore, positive results of serum testing must be confirmed by other methods. Indirect immunofluorescence method has been previously used for this purpose [9], then it was replaced by immunoblotting which is characterized by high specificity and sensitivity similar to those in ELISA. Additionally, immunoblotting allows detecting antibodies in poorly preserved sera with a high degree of certainty [7] and a simple and objective interpretation of results [11, 12].

One of the virus proteins responsible for antibody production induced by the natural infection, p72, is the main component of the virus capsid [18].

Proteins p30 and p54 were identified as highly antigenic [6, 10, 11, 14, 15, 16].

Polyprotein pp62 is the precursor protein of mature products p35 and p15, structural proteins localized at the core shell [4]. Polyprotein PP62 is maintained for a long time in sera from ASFV-infected pigs, while less reactivity was detected against p30 and p54 [6]. These results may

indicate that antibodies against pp62 are more stable than antibodies to other proteins.

Studies of 12 recombinant proteins possessing antigenic activity have been reported: three nonstructural (F334L, K196R and NP419L), four unassigned proteins (B602L, C44L, Cp312R and K205R), three previously identified structural proteins p30 (CP204L), p54 (E183L), and p72 (B646L) and two bacterial histone-like proteins (A104 R), and p10 (K78R). The analysis was performed using sera collected from experimentally infected pigs. The highest antibody titers were reported for 4 out of 12 tested proteins: p54, K205R, A104R and B602L [21]. In two years antigenicity of these recombinant proteins was confirmed by tests using sera from naturally ASF infected pigs [13]. Their ELISA activity was compared to immunoblotting activity (OIE approved "golden standard"). The comparison was performed using serum samples collected from animals in European countries as well as serum samples delivered from Western and Eastern Africa. It is worth mentioning that results obtained during the analysis of large collection of blood sera from susceptible animals from Europe and Africa were comparable with the results obtained using OIE recommended TF ELISA Kits.

In order to test the practicability of these recombinant proteins for ELISA 39 serum samples previously classified as ASF positive by OIE approved tests were left at 37°C for 1 month. Each protein was subsequently ELISA tested using these sera. The results were compared with data from untreated sera and reactivity loss variable was determined depending on the recombinant protein used. Despite unsatisfactory results obtained using pA104R-ELISA the majority of previously positive sera remained positive after heat treatment with p54 and pB602L-ELISA proteins. Overall compilation of results for the three proteins (p54-, pB602L- and pK205R-ELISA) demonstrated that out of 39 heat-treated positive samples only one sample was negative. The test sensitivity amounted to 95% for 54-ELISA, 87% – for pB602L-ELISA, 80% – for pK205R-ELISA and 31% – for pA104R-ELISA, while sensitivity of the OIE recommended TF ELISA Kit amounted to 87% [19].

In order to test the method sensitivity for field sera the ASF positive blood sera of pigs from Western Africa were examined. TF ELISA based on the above mentioned ASFV recombinant proteins demonstrated high sensitivity; there were no false negative results.

In view of the analytical data of the blood serum samples collected from pigs in Eastern Africa, there can be noted low sensitivity but high specificity in ELISA. The obtained results can be explained by high genotypic diversity of the ASFV isolates.

Eventually summarized data demonstrated that as opposed to Western Africa and Europe, where the proteins can be successfully introduced in practical diagnosis, use of tested proteins is impractical for ASF diagnosis in blood sera of pigs from Eastern Africa [19].

In 2011 a paper was published following the investigation results obtained by the experts of the SSI NRRIV&M of RAAS. The paper illustrated the analysis of the efficacy of p30 and p72 ASFV proteins [2]. The investigation was aimed at TF ELISA testing of the ASFV antibody production at different disease patterns as well as their level in the animal blood sera at the acute and chronic disease. P30 and p72 testing as diagnostic antigens demonstrated their specificity for detection of antibodies to serotype I, II, III, IV ASFV in pig reference sera. Parenteral infection of gilts was performed for examination of initial stages of antibody formation process in pigs infected with highly virulent ASFV isolates. In 5–10 dpi blood and spleen were collected from died animals and tested for antibodies to p72 and p30 ASFV proteins using indirect TF

ELISA. The results demonstrated that use of the proteins aided to the detection of antibodies in spleen on 5 dpi and in blood – on 7 dpi. The longer is the period from the moment of the infection the higher is the titer of specific antibodies in the blood and the lower is the titer in the spleen. Experiments involving infection with low virulent virus isolates and subsequent blood testing according to the same protocol were made for more exact analysis. It was demonstrated that use of recombinant p30 protein and its combination with recombinant p72 protein increased the reaction sensitivity 4-8-fold as compared to recombinant p72 alone and as compared to specific cultural antigen. Therefore, combination of recombinant p30 and p72 proteins aides to the increase of indirect TF ELISA sensitivity and specificity during the analysis of sera for ASFV-specific antibodies [2].

J. M. Oviedo, F. Rodriguez et al analyzed the comparative data of E183L and CP204L genetic sequences encoding p54 and p30 proteins, respectively, in different field isolates and virus strains isolated in different territories at different time. Experimental use of p54 and p30 as an antigen in TF ELISA and immunoblotting is indicative of the possibility to use p30 protein as an antigen in TF ELISA while p54 protein is preferred as ASFV antigen for antibody detection using immunoblotting [14].

It is worth mentioning that the obtained results can be correlated with the data obtained by M. G. Barderasa, A. Wigdorovitz et al (2000) about practicability of the use of p30 ASFV protein as an antigen in ELISA performed for serological diagnosis of the disease [20].

C. Cubillosa, S. Gómez-Sebastiano et al analyzed and tested recombinant proteins in pig blood sera from different countries and continents. Results of African pig serum tests demonstrated that use of p30r protein of Morara/Georgia strain in TF ELISA provided about 98% specificity irrespective of the serum origin (Eastern, Central or Western Africa). Herewith, the sensitivity varied from 90% (Western Africa) to 100% (Eastern Africa). This might be related to high genetic variation of the ASFV isolates [5]. Nevertheless, difference in sensitivity was significantly lower than D. M. Pérez-Filgueira et al previously reported on use of p30r proteins of E70 strain, which provided sensitivity of 70% and 100% in case of samples from Eastern and Western Africa, respectively. Therefore, the conclusion can be made that use of p30r protein of Morara/Georgia strain in TF ELISA provides sufficiently high specificity (97–98%) and sensitivity (90–100%) of the method for ASF serological diagnosis in the countries of South-Eastern (Mozambique), Central (DR Congo) and Western (Senegal) Africa. It was supposed that combination of p30r proteins of E70 and Morara/Georgia strains provided for unified TF ELISA test for ASF diagnosis [17].

Thus, an available and inexpensive serological test is described, the use of which will allow for precise determination of ASFV antibodies irrespective of the geographic origin of the tested serum [5].

DISCUSSION

Routine analyses such as TF ELISA or immunoblotting based on the use of ASFV infected cell extract are successfully used for diagnosis of subacute and asymptomatic disease but there is a number of deficiencies mostly related to biohazard and complexity of diagnostic interpretation and standardization problem.

Numerous investigations demonstrate the need for use of recombinant proteins for ASF serological diagnosis as due to the absence of specific prevention measures the issue of the disease diagnostic tool improvement is challenging. Knowledge of recombinant technologies is on the up and current international cooperation allows for

the exchange of experience and development of globally used high quality and safety tests.

Use of recombinant proteins in diagnosis has the following advantages as compared to the methods using antigens from infected cell extracts:

- 1) the antigen is prepared without potentially dangerous live virus;
- 2) the recombinant antigen does not contain any cell culture components that increases the antigen purity;
- 3) there is no need to inactivate the virus that preserves the antigen conformational epitopes in their native state;
- 4) this allows the antigen standardization that increases the consistency of results obtained in different laboratories.

CONCLUSIONS

Foreign practice of testing porcine sera for ASF-specific antibodies demonstrated the efficiency and expediency of recombinant protein usage.

The feasibility of cloning and expressing of genes encoding required proteins was shown by foreign and national investigations. Various available techniques of recombinant protein preparation allow the laboratory to choose the most convenient and the most efficient and high quality technique.

Thus, the recombinant protein-based method for detection of antibodies in sera is a reproducible and safe alternative to the conventional methods. This allows the antigen to be standardized during the production process making infectious material handling unnecessary. Investigations of ASF virus recombinant proteins for their usage in serological diagnosis showed promising results. Furthermore, the said proteins have additional advantages: they simplify test interpretation, increase test reproducibility and provide higher sensitivity in tests of poorly preserved serum samples.

These data confirmed the reasonability of ASF viral recombinant protein use for ASF diagnosis namely for the detection of specific antibodies by various ELISAs. Recombinant protein-based ELISAs consistently demonstrate high specificity and sensitivity and give reliable results at various disease patterns and different disease stages.

REFERENCES

1. Viral animal diseases / V.N. Syurin, A.Ya. Samuylenko, B.V. Solovyev, N.V. Fomina. – M: VNITIBP, 1998. – 928 p.
2. Recombinant proteins in investigation of African swine fever / A.S. Kazakova, T.E. Uyzhuk, Yu. F. Kalantaenko [et al.] // Scientific Journal of the Kuban State Agrarian University. – 2011. – No. 67(03).
3. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence / C.L. Afonso, L. Zsak, C. Carrillo [et al.] // J. Gen. Virol. – 1998. – Vol. 79, № 1. – P. 2543–2547.
4. African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell / G. Andrés, A. Alejo, J. Salas, M.L. Salas // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76. – P. 12473–12482.
5. African swine fever virus serodiagnosis: A general review with a focus on the analyses of African serum samples / C. Cubillos, S. Gómez-Sebastian, N. Moreno [et al.] // Virus Research. – 2013. – URL: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SEROLOGIA_CISA.pdf.
6. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus pro-teín pp62 expressed in insect cells / C. Gallardo, E. Blanco, J.M. Rodríguez [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44. – P. 950–956.

7. Arias M., Escribano J.M., Sánchez-Vizcaino J.M. Persistence of African swine fever antibody reactivity on ELISA and immunoblotting assays // Veterinary Record. – 1993. – Vol. 133. – P. 189–190.

8. Asfarviridae / L.K. Dixon, C. Alonso, J.M. Escribano [et al.] // Virus Taxonomy / ed. M.Q. Andrew [et al.]. – Oxford, 2011. – P. 153–162.

9. Botija C.S. Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence // Bulletin de l'Office International des Epizooties. – 1970. – Vol. 73 – P. 1025–1044.

10. Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus / C.L. Afonso, C. Alcaraz, A. Brun [et al.] // Virology. – 1992. – Vol. 189. – P. 368–373.

11. Comparison of a radioimmuno-precipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus / C. Alcaraz, M. De Diego, M.J. Pastor, J.M. Escribano // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1990. – Vol. 2. – P. 191–196.

12. Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay / M.J. Pastor, M.D. Laviada, J.M. Sanchez-Vizcaino, J.M. Escribano // Canadian Journal of Veterinary Research. – 1989. – Vol. 53. – P. 105–107.

13. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes / C. Gallardo, M.M. Dufon, J.M. Macharia [et al.] // Virus Genes. – 2009. – Vol. 38. – P. 85–95.

14. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents / J.M. Oviedo, F. Rodriguez, P. Gómez-Puertas [et al.] // Journal of Virological Methods. – 1997. – Vol. 64, № 1. – P. 27–35.

15. Highly specific confirmatory western blot test of African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54 / C. Alcaraz, F. Rodriguez, J.M. Oviedo [et al.] // Journal of Virological Methods. – 1995. – Vol. 52. – P. 111–119.

16. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody / S.D. Kollnberger, B. Gutierrez-Castaneda, M. Foster-Cuevas [et al.] // Journal of General Virology. – 2002. – Vol. 83. – P. 1331–1342.

17. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae / D.M. Pérez-Filgueira, F. González-Camacho, C. Gallardo [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – Vol. 44. – P. 3114–3121.

18. Proteins specified by African swine fever virus. II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties / E. Tabarés, J. Martínez, F. Ruiz Gonzalvo, C. Sánchez-Botija // Archives of Virology. – 1980. – Vol. 66 (2). – P. 119–132.

19. Recombinant Antigen Targets for Serodiagnosis of African Swine Fever / C. Gallardo, A.L. Reis, G. Kalem-Zikusoka [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2009. – Vol. 16 (7). – P. 1012–1020.

20. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae / M.G. Barderasa, A. Wigdorovitzb, F. Mereloc [et al.] // Journal of Virol. Methods. – 2000. – Vol. 89, № 1–2. – P. 129–136.

21. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus / A.L. Reis, R.M. Parkhouse, A.R. Penados [et al.] // Journal of General Virology. 2007. – Vol. 88. – P. 2426–2434.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЛАБОВИРУЛЕНТНОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

В.Ю. Кулаков¹, Д.Б. Андрейчук², С.А. Похвальный³, К.Ю. Федосеев⁴

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

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

³младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Исследовали свойства изолята вируса инфекционного ларинготрахеита птиц, обуславливающего стертую клиническую картину болезни. Установили, что возбудитель способен инфицировать восприимчивых птиц через слизистые оболочки конъюнктивы и гортани, передается по контакту при совместном содержании и проникает в центральную нервную систему птиц.

Ключевые слова: инфекционный ларинготрахеит птиц, изолят вируса, патогенез, ПЦР-РВ.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ларинготрахеит птиц (ИЛТ) – высококонтагиозное заболевание вирусной этиологии, сопровождающееся респираторным симптомокомплексом и конъюнктивитами. Патогномичным признаком данной инфекции является воспалительный процесс в гортани и верхнем отделе трахеи, сопровождающийся возникновением казеозных образований, ведущих к закупорке трахеального просвета и асфиксии птицы. Возбудитель ИЛТ – ДНК-содержащий вирус семейства *Herpesviridae* рода *Iltovirus*. В современной таксономии отнесен к таксону *Gallid herpesvirus* [10].

ИЛТ, будучи распространенным во всех странах мира с развитым промышленным птицеводством, в настоящее время является актуальной проблемой для Российской Федерации, где в течение последних 20 лет 11 регионов рассматривались как неблагополучные [1, 2]. Значимость исследований, посвященных изучению ИЛТ птиц, подтверждается более чем 40 научными работами, опубликованными с 2005 г. в таких авторитетных изданиях, как «*Avian Diseases*» и «*Avian Pathology*».

Сложность контроля ИЛТ в промышленных масштабах обусловлена несколькими причинами.

Во-первых, это высокая степень вариабельности фенотипа возбудителя по признаку вирулентности [6, 9, 11]. Слабовирулентные штаммы вируса ИЛТ могут неограниченно долго циркулировать в стаде, обнаруживая себя только в виде гуморальной иммунной реакции птиц, практически не обуславливая клинических признаков болезни. При этом вирулентность таких штаммов неожиданно может возрасти, что приводит к возникновению вспышки заболевания [8].

Во-вторых, вирус ИЛТ (в том числе у реконвалесцентов) способен к хронической пожизненной персистенции в организме хозяина [12], которая может быть бессимптомной, но при этом периодически сопровождается экскрецией инфекционного возбудителя. Таким образом, внешне клинически здоровая птица может служить источником инфекции.

В-третьих, специфическая профилактика ИЛТ, основанная на применении живых вакцин, не всегда является эффективной, поскольку, как правило, прививаются птицы в возрасте более 25 суток, когда полевой вирус уже мог инфицировать поголовье. Вирусвакцины против ИЛТ обладают высокой реактогенностью и обычно не используются для цыплят меньшего возраста.

Целью настоящего исследования являлось изучение вирулентных свойств изолята вируса ИЛТ, его способности инфицировать макроорганизм, проникая через слизистые оболочки верхних дыхательных путей и конъюнктиву, места локализации и распространения вируса в организме хозяина, а также способности к контактной передаче (инфицирование восприимчивых птиц при совместном содержании). При этом предполагалось использовать опосредованное выявление возбудителя путем индикации его генома с использованием количественной ПЦР.

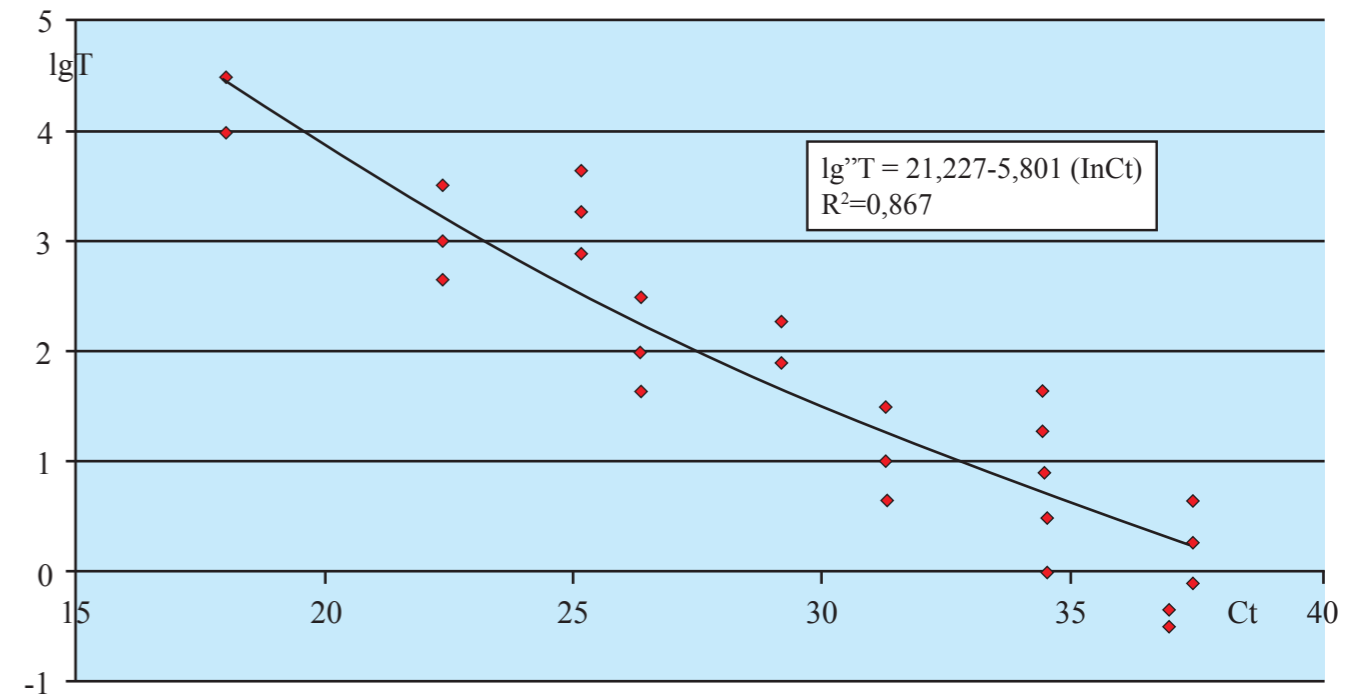
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус ИЛТ. В опытах использовали:

1. Штамм «О» вируса ИЛТ в составе коммерческой эмбрион-вакцины (лиофилизированный гомогенат ткани вирусосодержащих хориоаллантоисных оболочек SPF-эмбрионов кур).

2. Изолят вируса ИЛТ, выделенный из соскоба слизистой оболочки трахеи с признаками слабого воспалительного процесса (легкие геморагии в верхней трети) от курицы, которая не была привита против ИЛТ, но при этом была сероположительной на антиген данного вируса. Указанный материал культивировали в развивающихся эмбрионах SPF-кур.

Эмбрионы кур. Развивающиеся эмбрионы кур в возрасте 11 суток фирмы Lohman Tiehrzucht (Германия) категории SPF (*Specific Pathogen Free*), имеющие сертификат, гарантирующий отсутствие в них 19 наиболее вероятных возбудителей болезней кур и антител к ним. Эмбрионы инкубировали в термостате при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и влажности $60 \pm 70\%$.



Инфицирование SPF-эмбрионов. Вирусосодержащий материал вносили на хориоаллантоисную оболочку эмбриона (ХАО) в объеме $0,1 \text{ см}^3$. По результатам овоскопии и последующего вскрытия эмбрионов определяли наличие характерных для вируса ИЛТ поражений ХАО. Из ткани пораженных ХАО готовили гомогенат, который после осветления (1500 g), использовали в опытах. Все расплодки вируса исследовали на исключение контаминации бактериальной микрофлорой или грибами, а также гемагглютинирующими антигенами.

Титрование вируса. Использовали метод последовательных разведений вирусных суспензий. Эмбрионы инфицировали способом, описанным в предыдущем пункте. Положительной реакцией считали наличие специфических поражений на ХАО на 6 сутки после заражения. Величину инфекционного титра (ЭИД_{50}) рассчитывали по методу Кербера.

Птицы. Цыплята в возрасте 25–30 суток мясных или яичных пород. Птиц содержали по 10–15 голов в клетках с решетчатыми стенками. Перед экспериментами все подопытное поголовье исследовали на исключение сыровороточных антител против ИЛТ.

Растворы и реактивы. Все работы, связанные с получением и исследованием вирусосодержащих суспензий, проводили на изотоническом фосфатном буфере (ФБР), pH 7,4–7,7, состава (%): NaCl (0,8); KH_2PO_4 (0,02); Na_2HPO_4 (0,283). При необходимости в буфер добавляли гентамицин из расчета 250–500 мкг/мл.

Инфицирование птиц. Для инфицирования птиц использовали эмбриональные расплодки изолята вируса ИЛТ. Вирусосодержащий материал в заданной дозе и контролируемом объеме применяли для окулярного и орального заражения соответствующих групп птиц. При окулярном заражении вирусный материал вносили под нижнее веко глаза птицы в объеме около $0,05 \text{ см}^3$ (приближенный объем одной капли). При оральном заражении вирусный материал вносили в раскрытый клюв птицы в объеме $0,5 \text{ см}^3$.

Клинический контроль и взятие диагностических проб от инфицированных птиц. Группы инфицированных птиц содержались отдельно соответственно

способу заражения. Каждая группа проходила ежедневный двукратный клинический осмотр. С заданной периодичностью от подопытных птиц отбирали диагностические пробы в виде аппликаций с конъюнктивы и гортани. С этой целью использовали стерильные ватные тампоны стандартного размера, смоченные перед применением в стерильном ФБР (объем смачивания около 200 мкл). После проведения аппликации тампоны помещали в герметичные пластиковые криопробирки (*Eppendorf tube, LXG 8500P*), которые хранили в холодильнике при минус 60°C . Для дальнейших исследований использовали жидкость после разморозки и отжима тампона.

Через заданные интервалы времени часть птиц подвергалась эвтаназии (парами хлороформа) и была использована для взятия образцов ткани нервных ганглиев головного мозга (объем образцов ткани около 100 мкл). Изъятые образцы помещали в криопробирки с ФБР (100 мкл) и хранили в холодильнике аналогично пробам, полученным после аппликаций. Для дальнейших исследований использовали суспензию нервной ткани в ФБР после ее интенсивной гомогенизации в этих же пробирках.

Контакт инфицированной и здоровой птицы. В качестве индукторов использовали птиц, которые были инфицированы окулярно и орально. Акцепторами служили птицы, размещенные в решетчатых клетках, находящиеся до эксперимента в другом помещении.

Через 5 суток после инфицирования индукторов к боковой стенке их клетки вплотную подставляли клетку с акцепторами. Над акцепторными птицами

с момента постановки их на контакт был установлен клинический контроль и периодический отбор диагностических проб по аналогии с индукторами (см. предыдущий пункт).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Для выявления и количественного определения копий вирусного генома использовали ПЦР-РВ. Для постановки реакции отбирали 100 мкл суспензии. Выделение суммарной ДНК проводили методом сорбции на силикагеле с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-50» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), согласно прилагаемому к нему протоколу. ПЦР-РВ проводили согласно протоколу S.A. Callison и др. [6] с праймерами ILTVgCU771 (5-CCTTGCGTTTGAATTTTCTGT-3), ILTVgCL873 (5-TTCGTGGGTAGAGGTCTGT-3) и ДНК-зондом ILTVprobe817, меченным флуоресцентным красителем FAM (5-FAM-CAGCTCGGTGACCCCATTTCTA-BHQ1-3). В реакции использовали Taq-ДНК-полимеразу с буфером и раствором MgCl₂ (Promega, США). Постановку реакции и анализ результатов проводили на приборе Corbett research Real-Time PCR System (Rotorgene, Австралия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. Разработка опосредованного способа оценки величины титра инфекционного вируса. Задачей данного этапа исследований было обнаружение связи между величиной титра инфекционного вируса ИЛТ (ЭИД₅₀), находящегося в свежеприготовленных на ФБР разведениях эмбрион-вакцины из штамма «О», и значениями пороговых циклов амплификации (Ct), параллельно установленных для данных образцов в ПЦР-РВ. Использование для этих исследований коммерческого препарата считали удобным в аспекте стандартности его инфекционной активности.

Приготовили ряд последовательных десятикратных разведений вирусного материала, при этом из каждого полученного разведения отобрали пробы для оценки инфекционного титра на эмбрионах и определения количества циклов амплификации в ПЦР-РВ. Диапазон испытываемых разведений включал семь десятикратных шагов. Определение инфекционного титра вируса для каждого образца проводили не менее трех раз.

На основе конечной оценки инфекционного титра по Керберу (lgT), установленной в исходном препарате, для каждого разведения вирусного материала (D), испытанного в ПЦР-РВ, определяли соответствующую концентрацию вируса (lgT = lgT - lgD). В результате были получены выборки параллельно установленных показателей lgT и Ct, между которыми определяли наличие связи. Полученные результаты представлены в виде диаграммы на рисунке.

Рисунок демонстрирует, что между концентрацией инфекционного вируса и количеством циклов амплификации в ПЦР-РВ присутствовала выраженная связь. Соответствующий коэффициент корреляции R = -0,931 ± 0,056 имел высокий уровень значимости (p ≤ 0,001). Развернутой характеристикой данной связи являлось полученное методом наименьших квадратов регрессионное уравнение вида:

$$\lg T/v = 21,227 - 5,801(\ln Ct),$$

где T/v – прогнозируемая величина титра вируса для заданного значения Ct в объеме образца тестируемо-

го в ПЦР-РВ; v = 0,1 см³.

Приведенное уравнение в условиях данного эксперимента по результатам ПЦР-РВ с достаточной точностью могло быть использовано для прогноза концентрации инфекционного вируса в исследуемых пробах. Вариация ожидаемого значения lgT (на основании стандартной ошибки регрессии) находилась в диапазоне (0,11 ÷ 0,27) lg, что не выходит за границы варьирования результатов, получаемых при обычной процедуре титрования на эмбрионах. Для практического использования результатов ПЦР-РВ приняли, что пригодными для интерпретации могут быть показатели, установленные в границах диапазона 17,50 ≤ Ct ≤ 38,80. Принятое условие предполагало возможность выявления инфекционного вируса в диапазоне (4,62 ÷ 0) lg ЭИД₅₀/0,1 см³. Полученные результаты достаточно хорошо согласуются с опубликованными данными [6, 7, 10].

2. Результаты исследования биологических свойств изолята вируса ИЛТ. Осветленный вирусосодержащий гомогенат ткани ХАО, полученный при пассаже изолята на развивающихся SPF-эмбрионах, имел среднюю оценку инфекционной активности (5,63 ± 0,18) lg ЭИД₅₀/см³. Из данного образца готовили вирусные материалы для заражения птиц.

Были образованы две группы птиц по 15 голов, которые содержались в изолированных боксах в решетчатых клетках. В одной подопытной группе было проведено окулярное заражение в дозе 10³ ЭИД₅₀/0,05 см³, в другой – оральное в дозе 10³ ЭИД₅₀/0,5 см³.

За подопытными птицами был установлен ежедневный клинический контроль. При этом с заданной периодичностью в обеих группах отбирали по две диагностические пробы (аппликации с конъюнктивы и гортани). Кроме этого, одну птицу в группе подвергали эвтаназии, производили патологоанатомический осмотр, брали образцы ткани зрительных бугров среднего мозга и фрагменты исходящих из них нервных волокон. Отбор диагностических проб производили в случайном порядке вне связи с клиническим проявлением инфекции.

Далее исследовали передачу инфекции при контакте. С этой целью через 5 суток после начала эксперимента в обеих опытных группах к боковым стенкам клеток с инфицированными птицами (индукторами) были подставлены клетки с 10 головами интактных птиц (реципиентов). В группах реципиентов порядок проведения опыта, в том числе отбор диагностических проб, был такой же, как у птиц-индукторов. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Приведенные в табл. 1 и 2 результаты клинических наблюдений и оценки концентрации вирусного генома в диагностических пробах, а также данные патологоанатомических вскрытий позволили сделать следующие заключения:

1. Исследуемый изолят представляет собой популяцию вируса ИЛТ, которая способна инфицировать птиц естественным путем, проникая через слизистые оболочки верхних дыхательных путей и конъюнктиву глаз. Инфекция передается при контакте при совместном содержании.

2. При фиксированной дозе заражения клинически идентифицируемая заболеваемость через 7 суток составляла 80 %. Заболеваемость реципиентов при совместном содержании с инфицируемыми донорами (при долговременном присутствии в осемененной вирусом атмосфере), вероятно, могла быть выше.

3. Клиническое проявление заболевания в обеих инфицированных группах было стертым. Присутство-

Таблица 1. Результаты исследования с помощью ПЦР-РВ проб патологического материала от птиц, зараженных слабовирулентным изолятом вируса ИЛТ при окулярном заражении птиц и передаче инфекции при контакте

Время от начала опыта, сут.	ОКУЛЯРНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ					КОНТАКТ				
	Кол-во птиц в группе, гол.	Доля птиц с клиническими признаками ИЛТ	Результаты ПЦР-РВ			Кол-во птиц в группе, гол.	Доля клинически больных птиц	Результаты ПЦР-РВ		
			Значения Ct**, установленные в диагностической пробе соответственно месту ее отбора					Значения Ct, установленные в диагностической пробе соответственно месту ее отбора		
			Конъюнктив	Гортань	Мозг***			Конъюнктив	Гортань	Мозг
0	15	0/15	neg	neg	neg					
			neg	neg	–					
3	14	3/14	22,0	23,4	neg					
			31,5	32,7	–					
4	13	5/13	21,1	23,2	neg					
			22,4	26,4	–					
5	12	9/12	30,7	27,2	neg					
			37,3	19,5	–					
6	11	8/11	23,1	33,3	neg	10	0/10	neg	neg	neg
			neg	neg	–					
7	10	8/10	24,9	33,8	neg	9	0/9	neg	neg	neg
			neg	neg	–					
8	9	8/9	–	–	–	8	0/8	–	–	–
9	9	8/9	–	–	–	8	0/8	–	–	–
10	9	7/9	31,6	34,9	37,0	8	2/8	24,6	32,7	neg
			28,5	27,9	–			22,5	19,2	–
11	8	3/8	36,6	39,3	36,5	7	3/7	20,6	37,7	neg
			34,7	29,5	–			32,4	29,2	–
12	7	2/7	34,3	neg	neg	6	2/6	neg	neg	neg
			neg	neg	–			28,0	25,9	–
13	6	0/6	neg	neg	neg	5	2/5	neg	neg	neg
			38,3	neg	–			39,9	31,3	–
14	5	0/5	neg	neg	neg	4	2/4	neg	neg	neg
			neg	neg	–			neg	neg	–
15	4	0/4	neg	neg	37,6	3	2/3	24,8	neg	neg
			neg	neg	–			neg	neg	–
16	2	0/2	–	–	–	2	2/2	–	–	–
			–	–	–			–	–	–
17	2	0/2	neg	neg	neg	2	2/2	33,2	25,0	36,2
			neg	neg	–			30,8	29,6	–
18	1	0	neg	neg	neg	1	1	24,3	19,9	neg

* наличие конъюнктивита или признаков трахеита (хрипы, кашель);

** величина порогового цикла амплификации, установленная в ПЦР-РВ;

*** ткань зрительных бугров среднего мозга и фрагменты исходящих нервных волокон;

neg – отрицательный результат (геном вируса не выявлен);

«-» – исследования не проводили.

Таблица 2. Результаты исследования с помощью ПЦР-РВ проб патологического материала от птиц, зараженных слабовирулентным изолятом вируса ИЛТ при оральном заражении птиц и передаче инфекции при контакте

Время от начала опыта, сут.	ОКУЛЯРНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ					КОНТАКТ				
	Кол-во птиц в группе, гол.	Доля птиц* с клиническими признаками ИЛТ	Результаты ПЦР-РВ			Кол-во птиц в группе, гол.	Доля клинически больных птиц	Результаты ПЦР-РВ		
			Значения Ct**, установленные в диагностической пробе соответственно месту ее отбора					Значения Ct, установленные в диагностической пробе соответственно месту ее отбора		
			Конъюнктура	Гортань	Мозг***			Конъюнктура	Гортань	Мозг
0	15	0/15	neg	neg	neg					
			neg	neg	–					
3	14	4/14	neg	neg	neg					
			neg	22,3	–					
4	13	4/13	18,1	25,5	neg					
			33,4	27,3	–					
5	12	7/12	23,1	20,2	neg					
			25,2	18,4	–					
6	11	7/11	28,1	29,8	neg	10	0/10	neg	neg	neg
			26,2	24,3	–					
7	10	8/10	24,9	31,6	neg	9	0/9	neg	neg	neg
			neg	neg	–			neg	neg	–
8	9	7/9	–	–	–	8	0/8	–	–	–
9	9	7/9	–	–	–	8	0/8	–	–	–
10	9	6/9	26,8	23,9	neg	8	1/8	36,4	22,4	neg
			28,4	32,2	–			29,5	23,2	–
11	8	3/8	31,3	29,4	36,5	7	4/7	28,6	28,9	neg
			neg	34,6	–			26,6	24,5	–
12	7	2/7	neg	35,2	neg	6	4/6	33,4	28,9	neg
			neg	neg	–			24,1	25,4	–
13	6	0/6	neg	neg	–	5	3/5	neg	neg	neg
			33,1	neg	30,8			29,9	26,4	–
14	5	0/5	32,4	26,8	neg	4	3/4	23,8	28,6	neg
			neg	neg	–			neg	neg	–
15	4	0/4	neg	neg	–	3	1/3	24,8	30,2	34,4
			neg	neg	29,6			neg	neg	–
16	2	0/2	–	–	–	2	2/2	–	–	–
	2	0/2	–	–	–	2	2/2	–	–	–
17	2	0/2	neg	neg	neg	2	2/2	33,2	25,0	36,2
			neg	neg	–			27,8	32,6	
18	1	0	neg	neg	neg	1	1	31,3	29,2	neg

* наличие конъюнктивита или признаков трахеита (хрипы, кашель);
 ** величина порогового цикла амплификации, установленная в ПЦР-РВ;
 *** ткань зрительных бугров среднего мозга и фрагменты исходящих нервных волокон;
 neg – отрицательный результат (геном вируса не выявлен);
 «-» – исследования не проводили.

вали слабовыраженные серозные конъюнктивиты (в основном односторонние). Кратковременные слабые признаки трахеитов имели место только у двух птиц в группе орального заражения. При патологоанатомическом осмотре в обеих группах, приблизительно у половины птиц, отмечены точечные кровоизлияния в слизистую оболочку верхней трети трахеи и присутствие небольшого количества серозного экссудата.

У реципиентов в группах контакта клиническая картина по характеру была подобной, однако еще менее выраженной. Клинические признаки трахеитов не отмечались. Воспалительные процессы в трахеи были значительно слабее.

4. В обеих группах, инфицированных фиксированными дозами, геном вируса ИЛТ присутствовал в полученных диагностических пробах в период с 3 по 13 (или 15) сутки после заражения. Это свидетельствует о возможности экскреции возбудителя в указанный период во внешнюю среду и передачи инфекции при контакте.

Рассчитанная ожидаемая концентрация потенциально экскретируемого вируса с поверхности конъюнктивы и слизистой гортани в среднем составляла 45,5 и 104,5 ЭИД₅₀/0,1 см³ в группе окулярно и орально инфицированных птиц, соответственно. В группах контактирующих реципиентов отмеченные оценки были схожими.

5. Изучаемый возбудитель был способен проникать в нервные ткани и головной мозг птицы. Геном возбудителя выделен из ткани зрительных бугров среднего мозга и фрагментов исходящих нервных волокон у 20% инфицированных птиц и реципиентов при окулярном заражении и у 20 и 10% инфицированных и реципиентов – при оральном заражении, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были изучены некоторые биологические свойства слабовирулентного изолята вируса ИЛТ. Отличительной особенностью данного фенотипа вируса являлась стертая клиническая картина заболевания. Однако возбудитель проявлял все свойственные ему признаки: инфекционность, способность к развитию в макроорганизме и накопление в экскретах, генерализация инфекционного процесса, сопровождающаяся поражением центральной нервной системы, и распространение при контакте [3, 5, 13].

Существенное снижение вирулентности штаммов вируса ИЛТ в естественных условиях является известным фактом [4, 11]. Такого рода фенотипическое изменение возбудителя в первую очередь отражается на клинической картине болезни и снижении заболеваемости в стаде. При этом все остальные свойства вируса ИЛТ потенциально сохраняются.

Особого внимания заслуживает способность вируса к проникновению и локализации в нервной ткани. Считается, что, находясь в нервных ганглиях головного мозга птицы, вирус способен к неограниченно долгому существованию в организме хозяина [5].

Полученные в ходе исследований результаты указывают на то, что при проведении диагностических мероприятий, направленных на выявление генома ви-

руса ИЛТ, целесообразно тестировать смывы со слизистых конъюнктивы и гортани птицы, а также образцы ткани зрительных бугров среднего мозга и фрагментов исходящих нервных волокон. Таким образом могут быть обнаружены хронические (бессимптомные) формы ИЛТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулов И.А. Эпизоотическая ситуация в мире по особо опасным и экзотическим болезням и меры по предупреждению их заноса в Россию // 100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности России: тез. науч.-произв. конф., 27–30 августа 1996 г. – Курск, 1996. – С. 29–31.
2. Кожемяка Н.В. Эпизоотическая обстановка в птицеводческих хозяйствах и перспективы ее улучшения // Ветеринария. – 1995. – № 12. – С. 3–7.
3. Bagust T.J., Calnek B.W., Fahey K.J. Gallid-1 herpesvirus infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease // Avian Dis. – 1986. – Vol. 30, № 1. – P. 179–190.
4. Clavijo A., Nagy E. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains by polymerase chain reaction // Avian Dis. – 1997. – Vol. 41. – P. 241–246.
5. Demonstration of sites of latency of infections laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction / R.A. Williams, M. Bennett, J.M. Bradbury [et al.] // J. Gen. Virol. – 1992. – Vol. 73. – P. 2415–2430.
6. Development and validation of a real-time Taqman® PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry / S.A. Callison, S.M. Riblet, I. Oldoni [et al.] // J. Virol. Meth. – 2007. – Vol. 139. – P. 31–38.
7. Development of a SYBR Green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus / A. Mahmoudian, N.C. Kirkpatrick, M. Coppo, [et al.] // Avian Pathol. – 2011. – Vol. 40. – P. 237–242.
8. Hanson L.E. Laryngotracheitis // Diseases of Poultry / ed. M.S. Hofstad [et al.]. – 8th ed. – Ames, Iowa, 1984. – P. 444–451.
9. Izuchi T., Hasagawa A. Pathogenicity of infectious laryngotracheitis virus as measured by chicken embryo inoculation // Avian Dis. – 1982. – Vol. 26. – P. 18–25.
10. Phylogenetic and molecular epidemiological studies reveal evidence of multiple past recombination events between infectious laryngotracheitis viruses. / S.W. Lee, J.M. Devlin, J.F. Markham [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 1–12.
11. Pulsford M.F. Infectious laryngotracheitis of poultry. Part I. Virus variation, immunology and vaccination // Vet Bull. – 1963. – Vol. 33. – P. 415–420.
12. Zum Nachweis der Latenz des attenuierten virus der infektiösen laryngotracheitis des Huhnes im trigeminusganglion / E. F. Kaleta, T.H. Redman, U. Heffels-Redman, K. Frese // Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. – 1986. – Vol. 93. – P. 40–42.
13. Zum Nachweis der Latenz des attenuierten Virus des infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes im Trigeminus - Ganglion / E.F. Kaleta, F. Dahger, K. Frese [et al.] // Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. – 1987. – Vol. 90. – P. 142–147.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF LOW VIRULENT AVIAN INFECTIONOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS ISOLATE

V.Yu. Kulakov¹, D.B. Andreichuk², S.A. Pokhvalny³, K. Yu. Fedoseyev⁴

¹ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, E-mail: kulakov@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

³ Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir

⁴ Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir

SUMMARY

The properties of infectious laryngotracheitis virus isolate inducing subtle disease were studied. It was established that the agent is able to infect susceptible poultry via conjunctiva and laryngeal mucosa, is transmitted by contact when birds are kept together and penetrates avian nervous system.

Key words: avian infectious laryngotracheitis, virus isolate, pathogenesis, real-time PCR.

INTRODUCTION

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a highly contagious viral disease characterized by respiratory symptoms and conjunctivitis. Pathognomonic symptom of this infection is an inflammatory process in larynx and upper trachea with caseous exudate formation resulting in blockage of tracheal lumen and suffocation. ILT causative agent is a DNA virus of *Herpesviridae* family, *Iltovirus* genus. In the modern taxonomy it is referred to *Gallid herpesvirus* taxon [10].

Being widely spread in all countries of the world with developed poultry production ILT is an actual problem for the Russian Federation, where 11 regions have been considered affected by this infection during the past 20 years [1, 2]. The significance of the ILT studies in poultry is supported by more than 40 scientific papers published since 2005 in such acknowledged printed sources as «*Avian Diseases*» и «*Avian Pathology*».

The complexity of ILT control on a commercial scale is conditioned by several factors.

First of all it's a high degree of the agent phenotype variability in virulence. [6, 9, 11]. Low virulent ILTV strains can circulate in herd for an unlimited time showing itself only in the form of humoral immune response in birds and without inducing any clinical signs. Moreover the virulence of such strains may increase unexpectedly resulting in an outbreak [8].

Secondly, ILTV is able to induce chronic life-time persistence in host (including in reconvalescent birds) [12], which may be asymptomatic but a bird may periodically shed the infectious agent. Thus a clinically healthy bird may be a source of infection.

Thirdly, ILT specific prophylaxis based on the use of live vaccines is not always efficient because as a rule, birds of not more than 25 days of age are subject to vaccination and by this time the field virus could have already infected the population. ILTV vaccines are highly reactogenic and are usually not used for younger chicks.

The task of this research was to study virulent properties of an ILTV isolate, of its ability to infect macroorganisms penetrating via upper respiratory tract and conjunctive mucosa, its localization sites and virus spread in a host as well as its ability to transmit by contact (infection of susceptible birds kept together). Indirect detection of the agent by its genome indication with quantitative PCR was used.

MATERIALS AND METHODS

ILT virus. Testing was performed using the following:

1. ILTV O strain from a commercial embryo vaccine (freeze-dried homogenate of virus containing chorioallantoic membrane of SPF chicken embryos).

2. ILTV isolate recovered from a tracheal mucosa scrape with signs of mild inflammation (slight hemorrhages in the upper third part) collected from a chicken which had not been vaccinated against ILT but had been seropositive for the virus antigen. The abovementioned material was cultured in SPF chicken embryos.

Chicken embryos. SPF (*Specific Pathogen Free*) 11 day-old chicken embryos produced by Lohman Tiehrzucht (Germany), with a certificate conforming the absence of 19 most frequent chicken disease agents and antibodies. The embryos were incubated in a thermostat at 37±0,5°C and 60÷70% humidity.

SPF-embryo inoculation. Virus-containing material was inoculated onto a chorioallantoic embryo membrane (CEM) in the amount of 0.1 cm³. Based on the candling results and subsequent post-mortem examination ILT-characteristic CEM lesions were assessed. Affected CEM tissues were used for homogenate preparation, which was clarified (1500 g) and then tested. All virus stocks were tested for bacterial and fungal contamination, as well as for contamination with hemagglutinating antigens.

Virus titration. Serial dilutions of virus suspensions were used. The embryos were inoculated as it was abovementioned. Presence of CEM specific lesions on 6 dpi was considered to be a positive reaction. Infectious titre (EID₅₀) was calculated using Karber's method

Poultry. 25-30 day-old meat or egg chicks. Birds were kept in mesh cages (10 – 15 birds per a cage). All experiment birds were tested for ILT serum antibodies before testing.

Dilutions and reagents. All procedures related to preparation and testing of virus containing suspensions were based on isotonic phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4–7.7, composition (%): NaCl (0.8); KH₂PO₄ (0.02); Na₂HPO₄ (0.283). If necessary gentamycin was added to buffer (250–500 µg/ml).

Poultry infection. Embryo virus stocks of an ILTV isolate were used to infect poultry. Virus containing material at the fixed dose and volume was used for an ocular and oral infection of respective poultry groups. For ocular infection viral material was administered under the lower lid of a bird in the amount of 0.05 cm³ (approximately one drop). For oral infection viral material was administered into an open beak of a bird in the amount of 0.5 cm³.

Clinical control and sampling of infected birds. Groups of infected poultry were kept separately in accordance with the route of their infection. Every group was clinically examined twice a day.

Experiment birds were subjected to a regular sampling, i.e. swabbing of larynx and conjunctive. Standard PBS-wetted sterile cotton tampons (wetting volume approximately 200 µl) were used for this purpose. After sampling the tampons were placed into air-proof plastic cryogenic tubes (*Eppendorf tube, LXG 8500P*), which were stored in a freezer at - 60°C. Samples were thawed and tampons were squeezed to obtain fluid for further testing.

Part of the birds were euthanized by chloroform fumes at regular intervals and used for sampling of brain ganglia tissue (sample volume approximately 100 µl). Collected samples were placed into cryogenic tubes with PBS (100 µl) and were stored in a freezer the way as it was described for the swabs above. Suspension of thoroughly homogenized nervous tissue in PBS using the same tubes was tested.

Contact of infected and healthy birds. Birds infected ocularly and orally were used as inductors. Birds placed into mesh cages and situated in another room served as recipients.

5 days post infection of inductors their cage was placed closely side by side to the cage with the recipients. The recipient birds from that moment were subject to clinical examination and regular sampling as it was described for the inductor birds (see the previous paragraph).

Real-time polymerase chain reaction. Real-time PCR was used for detection and identification of viral genome copies. 100 µl of suspension was taken for the test. DNA extraction was performed by adsorption on silica gel using test kit «DNA-sorb-50» (Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Rospotrebnadzor, Russia) in accordance with the manufacturer's instructions. Real-time PCR was carried out according to the procedure developed by S.A. Callison *et al.* [6] using primers ILTVgCU771 (5-CCTTGCCTTGAATTTTCTGT-3), ILTVgCL873 (5-TTCGTGGGTAGAGGTCTGT-3) and DNA-probe ILTVprobe817, labeled with FAM (5-FAM-CAGCTCGGTGACCCATTCTA-BHQ1-3). Taq-DNA-polymerase with buffer and MgCl₂ solution was used in the reaction (Promega, США). The test and result interpretation were carried out using Corbett research Real-Time PCR System (Rotorgene, Australia).

RESULTS AND DISCUSSION

1. *Development of indirect method for the virus titre assessment.* The task of this stage of research was the establishment of a linkage between the ILT virus titre (EID₅₀) of freshly prepared embryo vaccines based on O strain and cycle threshold values (**Ct**) established for these samples in real time PCR. The use of a commercial drug for these purposes was considered to be convenient because it's infectivity is standard.

Serial tenfold dilutions of virus material were made. Every prepared dilution was sampled to assess the infectious titre in embryos and determine the number of amplification cycles for real-time PCR. The range of tested

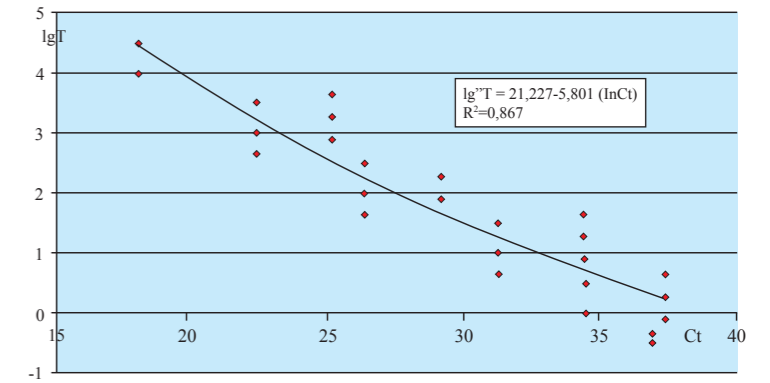


Fig. The correlation between cycle threshold value (Ct), established in real-time PCR and ILT infectious virus titre (T, EID₅₀) for SPF-embryos. The distribution of individual IgT (♦) estimates in correlation to established Ct values is shown. The Figure demonstrates the dependence diagram for tested parameters built based on the following regression equation: $IgT = 21,227 - 5,801(\ln Ct)$, where T is a predicted virus titre for an established Ct value. Regression model adequacy ratio (R²) is given.

dilutions covered seven of tenfold dilutions. The infectious titre was calculated at least three times for every sample.

Based on the final calculation made by Karber's method (IgT) for the original drug in every dilution of virus material (D) and tested in real-time PCR the appropriate virus concentration was determined ($IgT = IgT - lgD$). As a result series of IgT and Ct values established in parallel were obtained and compared. The obtained results are shown in diagram below.

The figure demonstrates a distinct connection between infectious virus concentration and the number of real-time PCR amplification cycles. The corresponding correlation coefficient $R = -0.931 \pm 0.056$ had a high level of significance ($p \leq 0.001$). This connection was in detail characterized by the least square regression equation:

$$IgT/v = 21,227 - 5,801(\ln Ct),$$

Where "T/v – predicted value of the virus titre for Ct fixed value in the sample volume tested in real-time PCR; v = 0.1 cm³.

Under the current experimental conditions based on the real-time PCR outcomes, the abovementioned equation could be accurately used under the experimental conditions to predict infectious virus concentration in the tested samples. The expected value of IgT (based on the standard regression error) varied within the range of (0.11÷0.27) Ig and it did not go beyond the variation limits of the results obtained in the regular embryo titration. In order to use real-time PCR results in practice, it was assumed that the values established within the range of 17.50≤Ct≤38.80 can be appropriate for interpretation. The assumption implied a possibility to detect infectious virus within the range of (4.62±0) Ig EID₅₀/0.1cm³. The results obtained correspond rather well to the data published (6, 7, 10).

2. *Biological characteristics of ILT virus isolate.* Cleared virus-containing CAM tissue homogenate obtained during the isolate passage in growing SPF - embryos demonstrated average infectivity value of (5.63 ± 0.18) Ig EID₅₀/cm³. The sample was used to prepare virus materials to infect birds. Birds were split into two groups of 15 and they were kept

Table 1. Results of real-time PCR used to test pathological material from birds infected with low-virulent ILT virus isolate following inoculation by the ocular route and as a result of contact transmission

Days following start of the experiment	OCULAR INFECTION					CONTACT				
	Number of birds in group	Number of birds with clinical signs of ILT	Real-time PCR results			Number of birds in group	Number of clinically affected birds	Real-time PCR results		
			Ct** value of the diagnostic sample in relation to the sample site					Ct value of the diagnostic sample in relation to the sample site		
			Conjunctiva	Larynx	Brain***			Conjunctiva	Larynx	Brain
0	15	0/15	neg	neg	neg					
			neg	neg	-					
3	14	3/14	22,0	23,4	neg					
			31,5	32,7	-					
4	13	5/13	21,1	23,2	neg					
			22,4	26,4	-					
5	12	9/12	30,7	27,2	neg					
			37,3	19,5	-					
6	11	8/11	23,1	33,3	neg	10	0/10	neg	neg	neg
			neg	neg	-					
7	10	8/10	24,9	33,8	neg	9	0/9	neg	neg	neg
			neg	neg	-					
8	9	8/9	-	-	-	8	0/8	-	-	-
9	9	8/9	-	-	-	8	0/8	-	-	-
10	9	7/9	31,6	34,9	37,0	8	2/8	24,6	32,7	neg
			28,5	27,9	-					
11	8	3/8	36,6	39,3	36,5	7	3/7	20,6	37,7	neg
			34,7	29,5	-					
12	7	2/7	34,3	neg	neg	6	2/6	neg	neg	neg
			neg	neg	-					
13	6	0/6	neg	neg	neg	5	2/5	neg	neg	neg
			38,3	neg	-					
14	5	0/5	neg	neg	neg	4	2/4	neg	neg	neg
			neg	neg	-					
15	4	0/4	neg	neg	37,6	3	2/3	24,8	neg	neg
			neg	neg	-					
16	2	0/2	-	-	-	2	2/2	-	-	-
			-	-	-					
17	2	0/2	neg	neg	neg	2	2/2	33,2	25,0	36,2
			neg	neg	-					
18	1	0	neg	neg	neg	1	1	24,3	19,9	neg

*conjunctivitis and tracheitis signs (groans, cough);
 ** value of threshold amplification cycle determined in real-time PCR;
 *** thalamic tissue of avian midbrain and fragments of its neurofibres;
 Neg- negative results (no virus genome);
 "-" - no tests carried out

Table 2. Results of real-time PCR used to test pathological material from birds infected with low-virulent ILT virus isolate following inoculation by the ocular route and as a result of contact transmission

Days following start of the experiment	OCULAR INFECTION					CONTACT				
	Number of birds in group	Number of birds with clinical signs of ILT	Real-time PCR results			Number of birds in group	Number of clinically affected birds	Real-time PCR results		
			Ct value** of the diagnostic sample depending on the sample site					Ct value of the diagnostic depending on the sample site		
			Conjunctiva	Larynx	Brain***			Conjunctiva	Larynx	Brain
0	15	0/15	neg	neg	neg					
			neg	neg	-					
3	14	4/14	neg	neg	neg					
			neg	22,3	-					
4	13	4/13	18,1	25,5	neg					
			33,4	27,3	-					
5	12	7/12	23,1	20,2	neg					
			25,2	18,4	-					
6	11	7/11	28,1	29,8	neg	10	0/10	neg	neg	neg
			26,2	24,3	-					
7	10	8/10	24,9	31,6	neg	9	0/9	neg	neg	neg
			neg	neg	-					
8	9	7/9	-	-	-	8	0/8	-	-	-
9	9	7/9	-	-	-	8	0/8	-	-	-
10	9	6/9	26,8	23,9	neg	8	1/8	36,4	22,4	neg
			28,4	32,2	-					
11	8	3/8	31,3	29,4	36,5	7	4/7	28,6	28,9	neg
			neg	34,6	-					
12	7	2/7	neg	35,2	neg	6	4/6	33,4	28,9	neg
			neg	neg	-					
13	6	0/6	neg	neg	-	5	3/5	neg	neg	neg
			33,1	neg	30,8					
14	5	0/5	32,4	26,8	neg	4	3/4	23,8	28,6	neg
			neg	neg	-					
15	4	0/4	neg	neg	-	3	1/3	24,8	30,2	34,4
			neg	neg	29,6					
16	2	0/2	-	-	-	2	2/2	-	-	-
			-	-	-					
17	2	0/2	neg	neg	neg	2	2/2	33,2	25,0	36,2
			neg	neg	-					
18	1	0	neg	neg	neg	1	1	31,3	29,2	neg

*conjunctivitis and tracheitis signs (groans, cough);
 ** value of threshold amplification cycle determined in real-time PCR;
 *** thalamic tissue of avian midbrain and fragments of its neurofibres;
 Neg- negative results (no virus genome);
 "-" - no tests carried out

in cages within isolated boxes. Group 1 received the dose of 103 EID₅₀/0.05 cm³ during ocular infection and Group 2 received 103 EID₅₀/0.5 cm³ orally.

Clinical examination of the experimental birds was carried out daily. Two diagnostic samples were taken from both groups at a fixed time interval (conjunctiva and larynx swabs). In addition to it, one bird in group was euthanized and subject to post-mortem examination. Midbrain thalamic tissues and fragments of its neurofibres were sampled. The diagnostic samples were taken randomly with no link to evident clinical signs.

Contact transmission of the infection was further studied. On day 5 of the experiment cages with 10 intact birds (recipients) were placed next to the sides of both experimental cages with infected birds (inductors). Experimental procedures including sampling for diagnostic purposes were carried out in the recipient groups the same way as they are carried out in the group of inductors. The results obtained are given in Table 1 and 1. Clinical supervision, evaluation of the virus genome concentration in the diagnostic samples, as well as post-mortem data provided in Table 1 and 2 suggest the following conclusions:

1. The tested isolate belongs to the ILT virus population that can infect birds naturally penetrating through mucosa of the upper respiratory tracts and conjunctiva. The infection is transmitted when birds are kept in contact.

2. Clinically identified morbidity rate was 80% on Day 7 at the stable infectious dose. Morbidity in recipients could have been higher when kept together with the infected donors (long presence in the virus-contaminated environment).

3. Clinical signs of the disease in both infected groups were subtle. Subtle signs of serous conjunctivitis (basically, unilateral) were evident. Short-time subtle signs of tracheitis were observed only in orally infected birds. Postmortem examination in the two groups (approximately in half of the experimental birds) demonstrated petechial hemorrhages in the mucosa of the upper third of trachea and some amount of serous exudates.

The contact group recipients demonstrated similar clinical signs; however, they were less evident. No clinical signs of tracheitis were observed. The inflammatory processes in the trachea were much weaker.

4. Both groups infected with fixed doses demonstrated ILT virus genome in the taken diagnostic samples within a 3-13 day interval (or on Day 15) post infection. It suggests that there is a possibility of the virus shedding and its contact transmission within the period.

The mean calculated expected concentration of the virus potentially shed from the conjunctiva surface and the larynx mucosa was 45.5 and 104.5 EID₅₀/0.1 cm³ in the groups of ocularly and orally infected birds, correspondingly. In-contact recipients demonstrated similar values.

5. The studied agent was able to penetrate into nerve tissues and avian brains. The agent genome was isolated from the midbrain thalamic tissue and fragments of its neurofibres in 20% of infected birds and recipients post ocular infection and in 20 out of 10% of infected and recipient birds post oral infection, correspondingly.

CONCLUSION

Some biological characteristics of low-virulent ILT virus isolate were studied. The virus phenotype is specifically characterized by subtle clinical signs. However, the agent also demonstrated all the typical characteristics: infectivity, ability to propagate in the macroorganism and to accumulate in excreta, generalized infection accompanied by affection of the nerve system and contact transmission (3, 5, 13).

It is well known that virulence of the ILM virus strains is reduced under natural conditions (4, 11). These phenotypic changes in the agent primarily have an impact on the disease

pattern and contribute to a decline in morbidity. At the same time all the other ILT virus properties are potentially retained.

Special attention shall be paid to the virus ability to penetrate into the nerve tissue and localize in it. It is assumed that in case the virus is located in the neural ganglia of the avian brain, it will be able to persist in the host for an unlimited period of time (5).

The results obtained suggest that in order to detect ILT virus genome within diagnostic activities, it is reasonable to test conjunctiva and larynx swabs and samples of thalamic tissue of the avian midbrain and fragments of its neurofibres. Thus, chronic (asymptomatic) forms of ILT can be detected.

REFERENCES

1. Bakulov I.A. Global epidemic satiation on highly dangerous and exotic diseases and measures taken to prevent their introduction to Russia // 100th anniversary of the Kursk Bio-plant and agrobiological industry in Russia: abstract; research and production conference, 27-30 august 1996, - Kursk, 1996. - P. 29-31.
2. Kozhemyaka N.V. Epidemic situation on poultry farms and prospects of improving the situation // Veterinaria. - 1995. - No.12. - P. 3-7.
3. Bagust T.J., Calnek B.W., Fahey K.J. Gallid-1 herpesvirus infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease // Avian Dis. - 1986. - Vol. 30, № 1. - P. 179-190.
4. Clavijo A., Nagy E. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains by polymerase chain reaction // Avian Dis. - 1997. - Vol. 41. - P. 241-246.
5. Demonstration of sites of latency of infections laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction / R.A. Williams, M. Bennett, J.M. Bradbury [et al.] // J. Gen. Virol. - 1992. - Vol. 73. - P. 2415-2430.
6. Development and validation of a real-time Taqman® PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry / S.A. Callison, S.M. Riblet, I. Oldoni [et al.] // J. Virol. Meth. - 2007. - Vol. 139. - P. 31-38.
7. Development of a SYBR Green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus / A. Mahmoudian, N.C. Kirkpatrick, M. Coppo, [et al.] // Avian Pathol. - 2011. - Vol. 40. - P. 237-242.
8. Hanson L.E. Laryngotracheitis // Diseases of Poultry / ed. M.S. Hofstad [et al.]. - 8th ed. - Ames, Iowa, 1984. - P. 444-451.
9. Izuchi T., Hasagawa A. Pathogenicity of infectious laryngotracheitis virus as measured by chicken embryo inoculation // Avian Dis. - 1982. - Vol. 26. - P. 18-25.
10. Phylogenetic and molecular epidemiological studies reveal evidence of multiple past recombination events between infectious laryngotracheitis viruses. / S.W. Lee, J.M. Devlin, J.F. Markham [et al.] // PLoS ONE. - 2013. - Vol. 8, № 2. - P. 1-12.
11. Pulsford M.F. Infectious laryngotracheitis of poultry. Part I. Virus variation, immunology and vaccination // Vet Bull. - 1963. - Vol. 33. - P. 415-420.
12. Zum Nachweis der Latenz des attenuierten Virus der infektiösen laryngotracheitis des Huhnes im trigeminusganglion / E. F. Kaleta, T.H. Redman, U. Heffels-Redman, K. Frese // Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. - 1986. - Vol. 93. - P. 40-42.
13. Zum Nachweis der Latenz des attenuierten Virus des infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes im Trigeminus-Ganglion / E.F. Kaleta, F. Dahger, K. Frese [et al.] // Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. - 1987. - Vol. 90. - P. 142-147.

ОДНОВРЕМЕННОЕ ИЗВЛЕЧЕНИЕ ВОСЬМИ МИКОТОКСИНОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ ИЗ ЗЕРНА, КОРМОВ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Н.М. Авдеева¹, В.Г. Амелин², А.В. Третьяков³

¹химик, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: avdeeva@arrih.ru

²ведущий научный сотрудник, доктор химических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

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

РЕЗЮМЕ

Разработана простая, экономичная и быстрая методика одновременного определения восьми микотоксинов: четырех афлатоксинов (В1, В2, G1, G2), двух охратоксинов (А и В), зеараленона и патулина в зерне и кормах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для извлечения микотоксинов из одной навески и очистки экстрактов от мешающих примесей применяли совместно два способа пробоподготовки: методы QuEChERS и дисперсионную жидкостно-жидкостную микроэкстракцию. Продолжительность анализа составляет 1–1,5 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

Ключевые слова: микотоксины, зерно, корма, высокоэффективная жидкостная хроматография, метод QuEChERS, дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция.

ВВЕДЕНИЕ

Зерно и корма подвержены загрязнению микроскопическими плесневыми грибами. Ненадлежащие условия хранения, а также повышение влажности окружающей среды при выращивании растений способствуют развитию плесени и образованию микотоксинов, их вторичных метаболитов. Чаще всего в кормах и зерне встречается сразу несколько микотоксинов различных классов, что приводит к увеличению их токсического действия в результате синергетического эффекта.

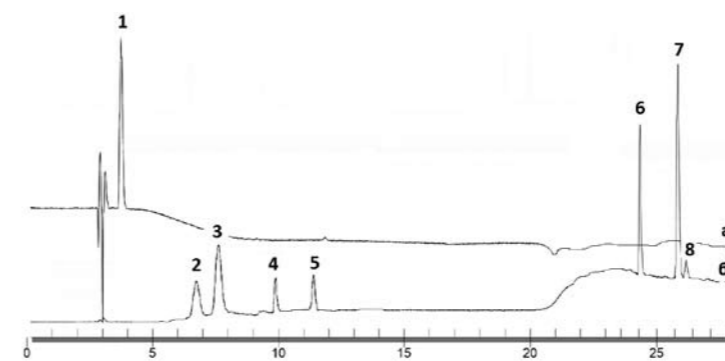


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси микотоксинов, полученная при параллельном использовании УФ- (а) и флуориметрического (б) детекторов: патулин (1,0 мкг/мл) (1), афлатоксин G1 (0,01 мкг/мл) (2), афлатоксин В1 (0,01 мкг/мл) (3), афлатоксин G2 (0,01 мкг/мл) (4), афлатоксин В2 (0,01 мкг/мл) (5), охратоксин В (0,01 мкг/мл) (6), охратоксин А (0,01 мкг/мл) (7), зеараленон (0,02 мкг/мл) (8)

Большинство методик, применяемых в Российской Федерации (ГОСТ, МУК), пригодны для извлечения и определения только небольшого числа микотоксинов (патулина, пяти афлатоксинов, охратоксина А, зеараленона (ЗОН), дезоксиниваленола (ДОН) и Т-2 токсина). Однако достаточно часто возникает потребность одновременного и быстрого определения микотоксинов при анализе кормов и зерна. К примеру, при отравлениях или гибели животных из-за некачественного корма требуется четко установить причину токсикозов за короткий срок, что затруднено из-за длительного и трудоемкого процесса пробоподготовки.

В последнее время для одновременного извлечения микотоксинов используют пробоподготовку по QuEChERS (Quick (быстрый), Easy (простой), Cheap (дешевый), Effective (эффективный), Rugged (надежный), Safe (безопасный)). Однако при такой пробоподготовке определение микотоксинов возможно лишь на дорогостоящем ГЖХ(ЖХ)МС/МС оборудовании, а использование более доступных для российских лабораторий хроматографов с флуориметрическим и УФ-детекторами затруднено в связи с недостаточной очисткой экстрактов.

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в разработке более простой, быстрой и экономичной методики одновременного определения восьми микотоксинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аппаратура. Применяли центрифугу ОПН-3М (DASTAN, Россия), центрифугу MPW-260R (MPW Med. Instruments, Россия). Использовали жидкостный хроматограф Flexar LC (Perkin-Elmer, США). Разделение проводили на колонке SUPELCOSIL™LC-18 5 мкм, 4,6×250 мм. Использовали флуориметрический детектор (Perkin-Elmer, США): длины волн возбуждения и детектирования для афлатоксинов 360 нм и 450 нм, соответственно, для охратоксинов и ЗОН – 333 нм и 460 нм, соответственно. Для определения патулина применяли УФ-детектор (Perkin-Elmer, США), длина волны детектирования 274 нм. В хроматограф вводили 10 мкл пробы. Использовали градиентное элюирование, применяли подвижную фазу CH₃CN:CH₃COOH 1%-й вод. 30:70, скорость потока 1,3 мл/мин в течение 5 мин и 1,4 мл/мин в течение 10 мин, CH₃CN:CH₃COOH 1%-й вод. 50:50, скорость потока 1,4 мл/мин в течение 0,5 мин, CH₃CN:CH₃COOH 1%-й вод. 60:40, скорость потока 0,7 мл/мин в течение 0,5 мин, CH₃CN:CH₃COOH 1%-й вод. 70:30, скорость потока 0,7 мл/мин в течение 14 мин. Температура термостата колонки 30 °С.



Реактивы. Использовали ацетонитрил для хроматографии (Merck, Германия), уксусную кислоту (ЗАО «Химреактив», Россия), сульфат магния, х.ч., хлорид натрия, х.ч., натрий лимоннокислый тризамещенный двойной гидрат, х.ч., натрий лимоннокислый двузамещенный полуторный гидрат, х.ч., сорбент Bondesil-PSA (Varian, США), сорбент DSC-18 (Supelco, США), трифторуксусную кислоту, х.ч. («Химмед», Россия), трихлорметан, х.ч. («Экос-1», Россия).

Пробоподготовка. Экстракцию микотоксинов и очистку экстрактов осуществляли по методу QuEChERS. Исследуемые образцы измельчали и отбирали среднюю пробу не менее 100 г. В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносили навеску измельченного и усредненного образца массой 2,0 г, добавляли 15,0 мл ацетонитрила и 10,0 мл воды, закрывали пробирку и энергично взбалтывали в течение 10 мин. Затем вносили смесь, состоящую из 4,0 г безводного сульфата магния, 1,0 г хлорида натрия, 1,0 г натрия лимоннокислого тризамещенного двойного гидрата и 0,5 г натрия лимоннокислого двузамещенного (полуторный гидрат). После внесения солей взбалтывали в течение 5 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, отбирали 8,0 мл верхней части экстракта и переносили в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, которая содержала смесь сульфата магния (0,95 г), сорбента Bondesil-PSA (0,15 г) и сорбент DSC-18 (0,15 г). Пробирку энергично встряхивали в течение 30 сек и центрифугировали 5 мин при 2700 об/мин.

Для избирательного извлечения и дополнительной очистки экстракта использовали метод дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ). Для одновременного извлечения охратоксинов и зеараленона в пробирку объемом 15,0 мл отбирали 4 мл экстракта, полученного после стадии QuEChERS, добавляли 400 мкл трихлорметана и с помощью шприца вносили в 10 мл воды. Для извлечения афлатоксинов и патулина использовали 2 мл ацетонитрильного экстракта и 300 мкл трихлорметана, смесь вносили в 5 мл воды. Полученные смеси встряхивали в течение 30 сек и центрифугировали 10 мин при 2700 об/мин, отбирали нижний слой в микрофлаконе, упаривали в токе азота досуха, к сухому остатку добавляли 0,05 мл трифторуксусной кислоты. Избыток кислоты упаривали в токе азота. Полученный экстракт рас-

Рис. 2. Общая схема определения восьми микотоксинов в зерне и кормах (продолжительность анализа 1,5–2 ч), при использовании пробоподготовки QuEChERS и ДЖЖМЭ

Таблица 1. Аналитические характеристики методики определения восьми микотоксинов в зерне и кормах (n=3, P=0,95)

Микотоксин	Диапазон линейности, мкг/мл	r ²	R, %	K	s _r	Зерно		Корма		МДУ, мкг/кг [3, 6]
						C _{мин} , мкг/кг	C _{макс} , мкг/кг	C _{мин} , мкг/кг	C _{макс} , мкг/кг	
Афл. В1	0,001–0,05	0,998	80±5	32,6	0,03	0,1	0,3	1,0	4,0	5, 50*
Афл. В2	0,001–0,05	0,999	75±4	30,6	0,05	0,1	0,3	1,5	5,0	н/н
Афл. G1	0,001–0,05	0,999	65±4	26,5	0,08	0,1	0,3	1,0	4,0	н/н
Афл. G2	0,001–0,05	0,997	78±8	31,8	0,03	0,1	0,3	1,5	5,0	н/н
Охр. А	0,025–0,25	0,998	91±9	74,6	0,02	1,0	2,5	2,0	10	50*
Охр. В	0,05–0,25	0,996	85±8	69,7	0,05	2,0	5,0	2,5	15	н/н
ЗОН	0,1–1,0	0,987	64±8	52,5	0,09	4,0	10	5,0	20	100, 1000*
Патулин	0,5–10	0,989	52±4	21,3	0,07	20	50	40	80	500*

* МДУ микотоксинов в кормах.



Рис. 3. Среднее время анализа для определения микотоксинов



Рис. 4. Примерная стоимость этапа пробоподготовки



Рис. 5. Объем растворителей, необходимый для пробоподготовки при извлечении микотоксинов

творяли в 500 мкл подвижной фазы (CH₃CN:CH₃COOH (1%-й вод.) – 70:30) и хроматографировали.

Правильность предложенных методик проверяли методом «введено-найдено». Для характеристики эффективности процесса пробоподготовки рассчитывали коэффициент концентрирования (K), степень извлечения (R) микотоксинов из образцов:

$$K = \frac{C_k}{C_0}; R = \frac{C_k V_k}{C_0 V_0} \times 100$$

где C_k и C₀ – концентрация аналита в конечном анализируемом растворе и начальная концентрация аналита в исходной пробе; V_k и V₀ – объем конечного анализируемого раствора-концентрата и объем пробы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые микотоксины относятся к различным классам, различаются по свойствам и строению, поэтому их одновременное извлечение и определение затруднено. Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ широко используют для определения данных веществ [7–10]. Молекулы афлатоксинов, зеараленона и охратоксинов способны интенсивно флуоресцировать, в связи с этим их можно определять одновременно с помощью флуориметрического детектора, путем смены длин волн возбуждения и детектирования в течение анализа. Для определения патулина флуориметрический

детектор непригоден, наиболее часто используют УФ-детектирование. Нами установлено, что благодаря параллельному использованию УФ- и флуориметрического детекторов в одном приборе стало возможным

Таблица 2. Результаты определения микотоксинов в зерновых культурах и кормах (n = 3, P = 0,95)

Токсин	Найдено (мкг/кг)					
	Сено	Силос	Комби-корм	Шрот соевый	Пшеница кормовая	Овес
Патулин	-*	-	-	-	-	-
ЗОН	7000±500	-	-	20±1 0,010	-	-
Охратоксин А	38±3	-	-	-	-	23±1
Охратоксин В	-	-	-	-	-	-
Афлатоксин В1	-	-	400±20 0,01	60±10 0,02	1,0±0,1 0,010	5,0±0,2 0,025
Афлатоксин В2	-	-	-	-	2,0±0,1 0,010-	-
Афлатоксин G1	-	69±12 0,12	5,0±0,3 0,002	-	-	-
Афлатоксин G2	-	-	-	-	-	-

* не обнаружено.

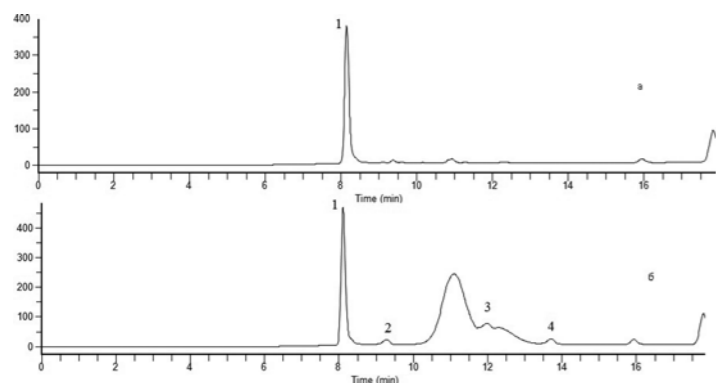


Рис. 6. Хроматограмма экстракта силоса без добавления (а) и с добавлением афлатоксина (б): 1 – G1 (0,025 мг/кг), 2 – B1 (0,025 мг/кг), 3 – G2 (0,025 мг/кг), 4 – B2 (0,025 мг/кг)

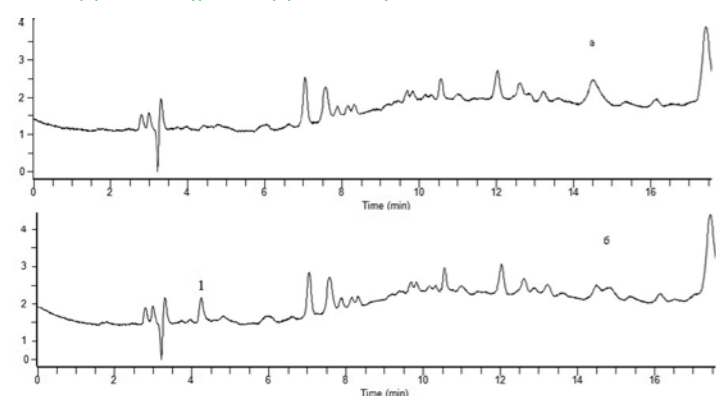


Рис. 7. Хроматограмма экстракта силоса без добавления (а) и с добавлением патулина (б) (0,05 мг/кг)

одновременное определение восьми микотоксинов разных классов одновременно (рис. 1).

Для извлечения микотоксинов использовали совместно два метода пробоподготовки – QuEChERS и ДЖЖМЭ, что позволило устранить влияние компонентов матрицы и избирательно извлекать микотоксины различных классов из одной навески зерна и кормов. Общая схема определения микотоксинов представлена на рис. 2.

Установлены аналитические характеристики методики определения микотоксинов (табл. 1): предел обнаружения (c_{\min}) и предел определения (c_{\lim}) для микотоксинов определены по соотношению сигнал:шум = 3:1 и 10:1, соответственно. Чувствительность определения микотоксинов в кормах ниже, чем в образцах зерна, что обусловлено увеличением фона шума из-за более сложной матрицы.

Разработанный способ извлечения позволяет значительно сократить время пробоподготовки и количество реактивов, необходимых для анализа. Сравнение основных характеристик предложенной методики и методик, представленных в ГОСТ [1, 2] и МУК [4, 5], показало, что использование совместно QuEChERS и ДЖЖМЭ является более дешевым, простым, экологичным и быстрым способом пробоподготовки (рис. 3–5).

С использованием способа пробоподготовки QuEChERS и ДЖЖМЭ были проанализированы образцы зерна и кормов, в том числе образцы, поступившие на анализ из-за их потенциальной опасности после отравления крупного рогатого скота. Установлено присутствие сразу нескольких микотоксинов почти

в каждом из образцов, в некоторых случаях обнаружено превышение значений концентраций микотоксинов, в том числе зеараленона в сене, афлатоксина В1 в комбикорме. На данный момент для большинства кормов не установлены максимально допустимые уровни микотоксинов, поэтому сложно судить о возможных превышениях, но присутствие микотоксинов в любом случае свидетельствует об угрозе здоровью животных и человека. Результаты определения микотоксинов представлены в табл. 2. На рис. 6–7 представлены хроматограммы экстракта силоса без добавок и с введенными добавками микотоксинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработан простой, экономичный, быстрый способ пробоподготовки, совмещающий методы QuEChERS и ДЖЖМЭ, позволяющий эффективно очистить экстракты и удовлетворительно извлечь восемь микотоксинов различных классов (50–100 %) одновременно из одной навески. Продолжительность анализа 1–1,5 ч, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ Р 53162-2008. Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. – М.: Изд-во стандартов, 2008. – 15 с.
- ГОСТ 28038-89. Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 8 с.
- Максимально допустимые уровни (МДУ) микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных: утв. 01.02.1989 г. ГУВ Минсельхоза СССР № 434-7.
- МУК 4.1.2204-07. Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. – М.: Изд-во стандартов, 2007. – 6 с.
- МУ 5177-90. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах. – М.: Изд-во стандартов, 1990. – 5 с.
- СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (токсичные элементы, пестициды, микотоксины): утв. 06.11.2001 г. – М: Минздрав России, 2001.
- Araguás C., González-Peñas E., López de Cerain A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain // J. Food Chemistry. – 2005. – Vol. 92, № 3. – P. 459–464.
- Egmond H.P., Heisterkamp S.H., Paulsch W.E. EC-collaborative study on the determination of aflatoxin B1 in animal feeding stuffs // Food Add. Cont. – 1991. – Vol. 86 № 1. – P. 17–29.
- Labuda R., Tancinova D. Incidence of trichothecenes and zearealenone in poultry feed mixtures from Slovakia // Intern. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 105, № 1. – P. 19–25.
- Trucksess M.W., Tang Y. Solid-Phase Extraction Method for Patulin in Apple Juice and Unfiltered Apple Juice // J AOAC Int. – 1999. – Vol. 82, № 5. – P. 1109–1114.

UDC 636.085.3:633.1:581.192:543

SIMULTANEOUS DETECTION OF EIGHT MYCOTOXINS OF DIFFERENT CLASSES FROM GRAIN AND FEEDS AND THEIR IDENTIFICATION WITH THE HELP OF HPLC

N.M. Avdeeva¹, V.G. Amelin², A.V. Tretyakov³

¹Chemist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: avdeeva@arriah.ru

²Leading Researcher, Doctor of Science (Chemistry), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir

³Head of the laboratory, Candidate of Science (Chemistry), FGBI "ARRIAH", Vladimir

SUMMARY

A simple, rapid and cost-effective method (High Performance Liquid Chromatography) was developed to ensure simultaneous detection of eight mycotoxins (four aflatoxins (B1, B2, G1, G2), two ochratoxin (A and B), zearealenone and patulin) in grain and feeds. Two sample preparation techniques were used to detect mycotoxins in one test portion and to purify the extracts from some impurities: QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). It takes 1-1.5 hours to carry out the test, relative standard deviation of the test results does not exceed 0.1.

Key words: mycotoxins, grain, feeds, high performance liquid chromatography, QuEChERS method, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME).

INTRODUCTION

Grain and feeds can be contaminated with microfungi. Inappropriate storage conditions and excessive humidity during plant cultivation promote mold growth and occurrence of mycotoxins which are their secondary metabolites. Pretty often grain and feeds may contain

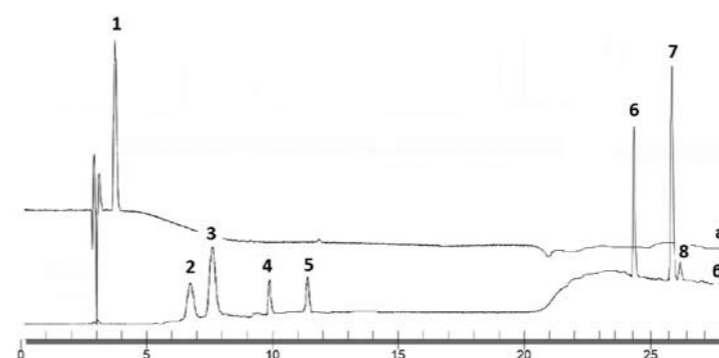


Fig. 1. Chromatogram of mycotoxin standard mixture obtained by parallel use of UV - (a) and fluorescence (b) detectors: penicidin (1.0 µg/ml) (1), aflatoxin G1 (0.01 µg/ml) (2), aflatoxin B1 (0.01 µg/ml) (3), aflatoxin G2 (0.01 µg/ml) (4), aflatoxin B2 (0.01 µg/ml) (5), ochratoxin B (0.01 µg/ml) (6), ochratoxin A (0.01 µg/ml) (7), zearealenone (0.02 µg/ml) (8)

mycotoxins of different classes and due to the synergistic effect it contributes to their toxicity.

Most methods used in the Russian Federation (GOST, MUK) are appropriate to detect and identify just a small number of mycotoxins (patulin, five aflatoxins, ochratoxin A, zearealenone (ZON), desoynivalenol (DON) and T-2 toxin). However, it is frequently required to simultaneously and rapidly recover mycotoxins when grain and feeds are tested. For example, when animals are poisoned with feeds or die of low-quality feeds, it is required to find the reason for intoxication as soon as possible but the procedure is complicated by time-consuming and labour-intensive sample preparation.

Sample preparation according to QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) has been recently used for simultaneous detection of mycotoxins. However, such sample preparation can be carried out only with the help of expensive equipment for GLC(LC) MS/MS and the use of chromatographs with fluorometric and UV-detectors is complicated by insufficiently purified extracts, although they are more affordable for the Russian laboratories.

Therefore, the purpose of this research is to develop a more simple, rapid and cheap method for simultaneous detection of eight mycotoxins.

MATERIALS AND METHODS

Equipment. The following equipment was used: centrifuge OPN-ZM (DASTAN, Russia), centrifuge MPW-260R ("MPW Med.instruments", Russia), liquid chromatography systems Flexan LC (Perkin-Elmer, the USA). Separation was carried out in the column SUPELCOSIL™LC-18 5 µm, 4.6x250 mm. Fluorometric detector (Perkin-Elmer, USA) was used: wave lengths for excitation and detection of aflatoxins were 360 nm and 450 nm, correspondingly, and for ochratoxins and ZON – 333 nm and 460 nm, correspondingly. UV-detector (Perkin-Elmer, USA) was used in order to detect patulin, the length of the detection wave is 274 nm. 10 µm of sample were injected into the chromatographer. Gradient elution was used and mobile phase CH3CN:CH3COOH 1% water was used, 30:70, flow rate 1.3 ml/min for 5

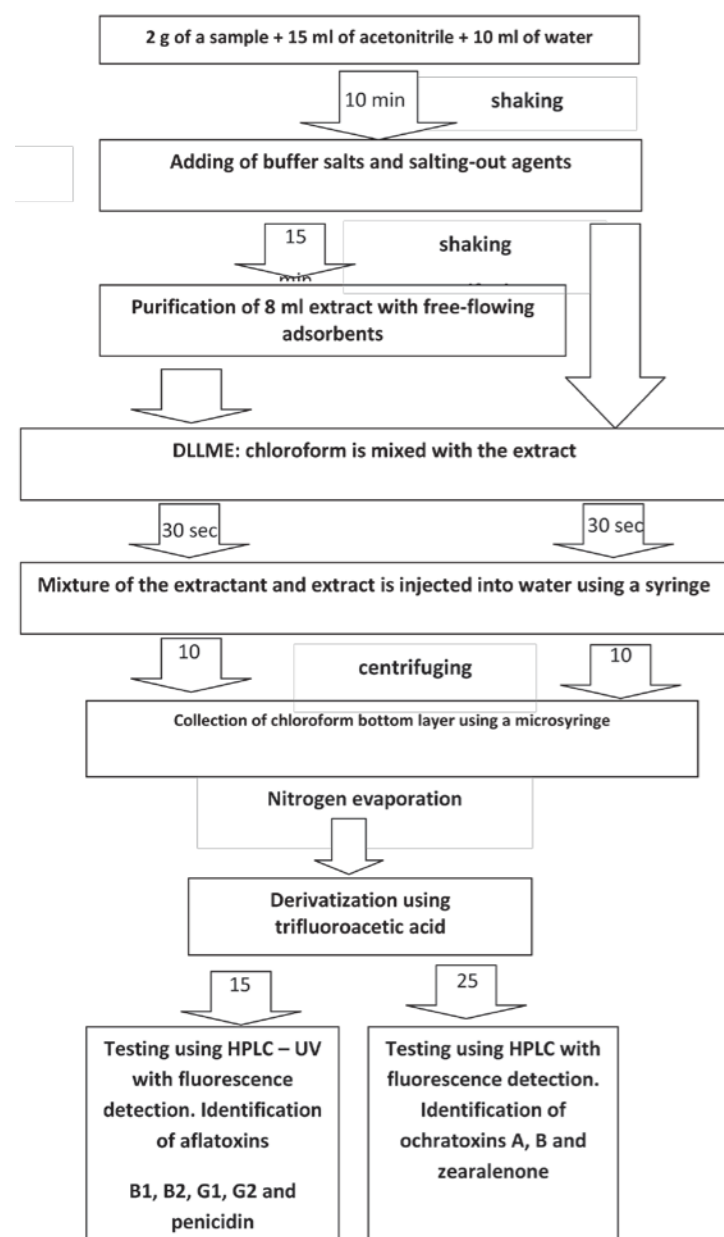


Fig. 2. General identification scheme of eight mycotoxins in grain and feeds (test duration is 90 – 120 minutes) using QuEChERS and DLLME sample preparation methods

Table 1. Analytical characteristics and methods for eight mycotoxins identification in grain and feed (n=3, P=0,95)

mycotoxin	linearity range, µg/ml	r ²	R, %	K	s _r	Grain		Feed		MAL, µg /kg [3, 6]
						c _{min} , µg /kg	c _{max} , µg /kg	c _{min} , µg /kg	c _{max} , µg /kg	
Afl. B1	0,001–0,05	0,998	80±5	32,6	0,03	0,1	0,3	1,0	4,0	5, 50*
Afl. B2	0,001–0,05	0,999	75±4	30,6	0,05	0,1	0,3	1,5	5,0	н/н
Afl. G1	0,001–0,05	0,999	65±4	26,5	0,08	0,1	0,3	1,0	4,0	н/н
Afl. G2	0,001–0,05	0,997	78±8	31,8	0,03	0,1	0,3	1,5	5,0	н/н
Ochr. A	0,025–0,25	0,998	91±9	74,6	0,02	1,0	2,5	2,0	10	50*
Ochr. B	0,05–0,25	0,996	85±8	69,7	0,05	2,0	5,0	2,5	15	н/н
Zearal.	0,1–1,0	0,987	64±8	52,5	0,09	4,0	10	5,0	20	100, 1000*
Penicidine	0,5–10	0,989	52±4	21,3	0,07	20	50	40	80	500*

* MAL for mycotoxins in feeds.

minutes and 1.4 ml/min during 10 min; CH₃CN:CH₃COOH 1% water 50:50, flow rate 1.4 ml/min during 0.5 min; CH₃CN:CH₃COOH 1% water 60:40, flow rate 0.7 ml/min during 0.5 min; CH₃CN:CH₃COOH 1% water 70:30, flow rate 0.7 ml/min during 14 min. The temperature of the column thermostat is 30°C.

Reagents. In order to carry out chromatography the following reagents were used: acetonitrile (Merck, Germany), acetic acid (ZAO Khimreaktiv, Russia), chemical grade magnesium sulfate, chemical grade sodium chloride, chemical grade tri-sodium citrate dihydrate, chemical grade di-sodium citrate sesquihydrate, Bondesil-PSA sorbent (Varian, the USA), DSC-18 sorbent (Supelco, the USA), chemical grade trifluoroacetic acid (Khimmed, Russia), chemical grade trichloromethane (Ecos-1, Russia).

Sample preparation. QuEChERS method was used to extract mycotoxins and to purify the extracts. The tested samples were ground and the average sample was taken at the minimum volume of 100g. A test portion of ground and average sample (2.0 g), 15.0 ml of acetonitrile and 10.0 ml of water were added into a 50-ml centrifugation tube and the tube was stoppered and vigorously shaken for 10 minutes. After that a mixture containing 4.0 g of water-free magnesium sulfate, 1.0 g of sodium chloride, 1.0 g of tri-sodium citrate dihydrate and 0.5 g of di-sodium citrate sesquihydrate was added. As soon as the salt were added they were shaken for 5 minutes and centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm, 8.0 ml of the extract upper levels were taken and transferred to a 15 ml centrifugation tube that contained a mixture of magnesium sulphate (0.95 g), Bondesil-PSA sorbent (0.15 g) and DSC-18 sorbent (0.15 g). The tube was vigorously shaken for 30 seconds and centrifuged for 5 minutes at 2700 rpm.

Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was used to selectively recover and additionally purify the extract. In order to carry out simultaneous recovery of ochratoxins and zearalenon 4 ml of the extract obtained after QuEChERS stage were added to a 15-ml tube, 400 µl of trichloromethane were injected into 10 ml of water. In order to recover aflatoxins and patulin, 2 ml of acetonitrile extract and 300 µl of trichloromethane were used; the mixture was added into 5 ml of water. The obtained mixtures were shaken for 30 sec and centrifuged for 10 min at 2700 rpm, the lower layer was sampled and the sample was transferred into a microfask, subjected to nitrogen

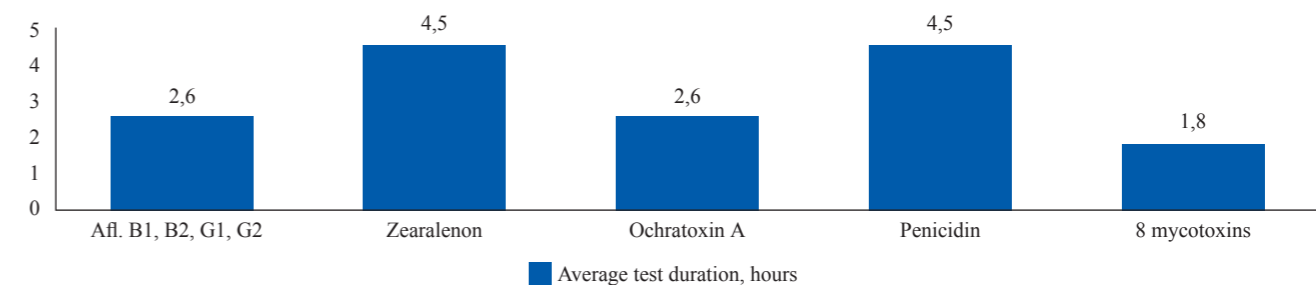


Fig. 3. Average test duration needed for mycotoxin identification

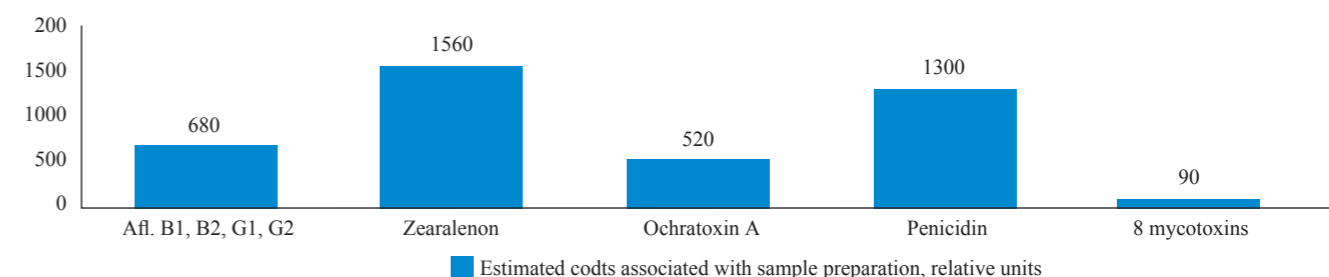


Fig. 4. Estimated costs associated with sample preparation

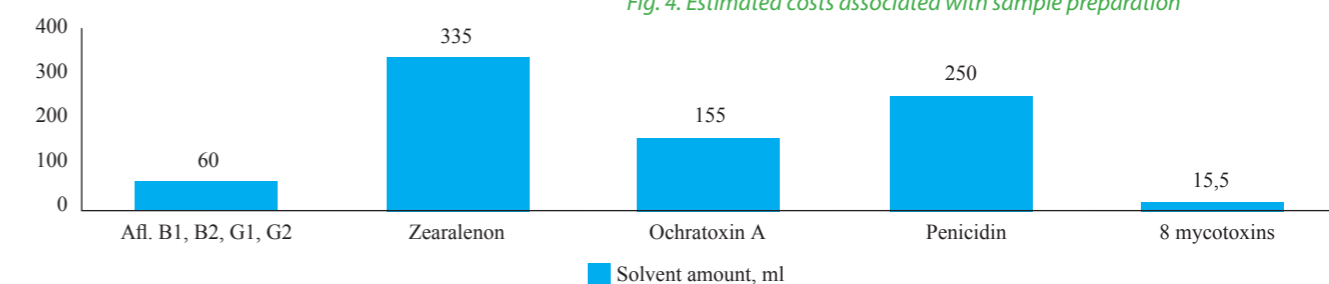


Fig. 5. Solvent amount needed for sample preparation

evaporation and 0.05 ml of trifluoroacetic acid were added to the dry matter. The obtained extract was dissolved in 500 µl of the mobile phase (CH₃CN:CH₃COOH (1% of water) 70:30) and was subjected to chromatography.

The accuracy of the suggested methods was checked by "injected-found" method. In order to characterize efficiency of the sample preparation process a concentration coefficient (K) and a recovery rate (R) for mycotoxins in the samples were calculated:

$$K = \frac{c_k}{c_0}; R = \frac{c_k V_k}{c_0 V_0} \times 100$$

Where c_k and c₀ – concentration of the analyte in a final analyzed solution and the initial concentration of the analyte in the original sample; V_k and V₀ – volume of the final analyzed concentrated solution and the sample volume.

RESULTS AND DISCUSSION

Tested mycotoxins refer to different classes, are different in properties and structure, that's why their simultaneous recovery and identification are complicated. Reverse phase HPLC is widely used to identify the abovementioned substances [7–10]. The molecules of aflatoxins, zearalenone and ochratoxins are capable to fluoresce intensively and due to this fact they can be detected simultaneously using fluorescence detector and by changing the disturbance and detection wavelengths

during the test. Fluorescence detector cannot be used for penicidin detection; UV detection is mostly used for this purpose. We established that the use of UV and fluorescence detectors in parallel in one apparatus made it possible to detect eight mycotoxins of different classes

Table 2. Results of mycotoxin identification in grains and feeds (n = 3, P = 0.95)

Toxin	Detected (µg/kg)					
	Hay	Silage	Com-pound feed	Soybean meal	Feed wheat	Oat
Penicidin	-*	-	-	-	-	-
Zearalenone	7000±500	-	-	20±1 0,010	-	-
Ochratoxin A	38±3	-	-	-	-	23±1
Ochratoxin B	-	-	-	-	-	-
Aflatoxin B1	-	-	400±20 0,01	60±10 0,02	1,0±0,1 0,010	5,0±0,2 0,025
Aflatoxin B2	-	-	-	-	2,0±0,1 0,010-	-
Aflatoxin G1	-	69±12 0,12	5,0±0,3 0,002	-	-	-
Aflatoxin G2	-	-	-	-	-	-

* not detected.

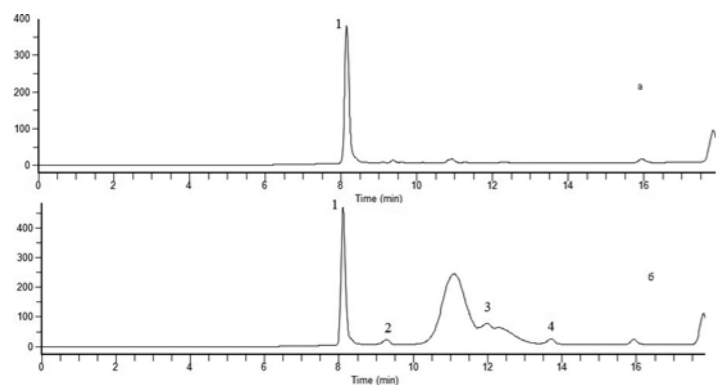


Fig. 6. Chromatogram of silage extract analyzing without and with aflatoxin fortification (6): 1 – G1 (0.025 µg/kg), 2 – B1 (0.025 µg/kg), 3 – G2 (0.025 µg/kg), 4 – B2 (0.025 µg/kg)

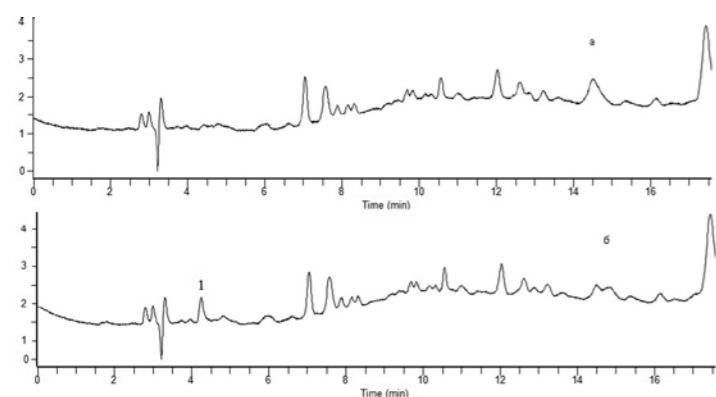


Fig. 7. Chromatogram of silage extract analyzing without and with penicidin fortification (6) (0.05 µg/kg)

simultaneously (Fig. 1).

Two sample preparation methods, QuEChERS and DLLME, were used for mycotoxin recovery and that enabled to remove the matrix component effect and extract mycotoxins of different classes selectively from one test portion of grain and feed. General scheme of mycotoxin identification is shown in Fig. 2.

Analytical characteristics of mycotoxin detection method are established (Table 1): limit of detection (c_{\min}) and limit of quantification (c_{lim}) for mycotoxins are based on the signal-to-noise ratio (3:1 and 10:1, respectively). The mycotoxin detection sensitivity is lower in feed samples than in grain samples due to increase of background noise in a more complicated matrix.

The developed recovery method enables to shorten the time of sample preparation significantly and reduce the quantity of reagents needed for testing. The comparison between the main characteristics of the proposed method and of methods described in GOST [1, 2] and MUK [4, 5], showed that joint use of QuEChERS and DLLME is a cheaper, simpler and more eco-friendly sample preparation procedure. (Fig. 3–5).

Using QuEChERS and DLLME sample preparation methods samples of grain and feed including those submitted for

testing due to their potential danger after cattle had been poisoned were analyzed. Several mycotoxins were detected simultaneously almost in every sample; in some cases MALs for mycotoxins were exceeded, including zearalenone in hay and aflatoxin B1 in compound feed. Currently mycotoxin MALs are not established for the most types of feeds, that's why it is hard to assess the possible excesses but in any case mycotoxin presence is indicative of risk for human and animal health. The results of mycotoxin identification are presented in Table 2. Fig. 6 – 7 show chromatograms for silage extract testing without and with mycotoxin fortification.

CONCLUSIONS

An easy, cost-effective, rapid sample preparation procedure was developed, which combines QuEChERS and DLLME methods and enables to purify extracts efficiently and extract eight mycotoxins of different classes (50–100%) from one test portion simultaneously. The duration of the analysis is 60 – 90 minutes; standard deviation is not more than 0.1.

REFERENCES

- GOST R 53162-2008. Food products. Detection of aflatoxin B1 and general content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in grains, nuts and their products. High performance liquid chromatography. – M.: Standard publications, – 2008. – p. 15.
- GOST 28038-89. Fruit and vegetable products. Method for penicidin detection. – M.: Standard publications, – 1989. – p. 8.
- Maximum admissible levels (MALs) for mycotoxins in feeds for livestock: approved on 01.02.1989. Veterinary Department of the USSR Ministry of Agriculture No. 434-7.
- MUK 4.1.2204-07. Detection, identification and quantification of ochratoxin A in food raw material and food products using HPLC. – M.: Standard publication, – 2007. – p. 6.
- MU 5177-90. Methodical instructions for detection, identification and quantification of deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone in grain and grain products. – M.: Standard publications. – 1990. – p. 5.
- SanPiN 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements to safety and nutritional value of food products (toxic elements, pesticides, mycotoxins): approved on 06.11.2001. – M: Russian Ministry of Health, 2001.
- Araguás C., González-Peñas E., López de Cerain A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain // J. Food Chemistry. – 2005. – Vol. 92, № 3. – P. 459–464.
- Egmond H.P., Heisterkamp S.H., Paulsch W.E. EC-collaborative study on the determination of aflatoxin B1 in animal feeding stuffs // Food Add. Cont. – 1991. – Vol. 86 № 1. – P. 17–29.
- Labuda R., Tancinova D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia // Intern. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 105, № 1. – P. 19–25.
- Trucksess M.W., Tang Y. Solid-Phase Extraction Method for Patulin in Apple Juice and Unfiltered Apple Juice // J AOAC Int. – 1999. – Vol. 82, № 5. – P. 1109–1114.

УДК 619:616.98:578.835.2:639.111.6

ВОСПРИИМЧИВОСТЬ И РОЛЬ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЯЩУРЕ

В.В. Никифоров¹, Т.К. Майорова², А.К. Караулов³, А.Н. Спиридонов⁴, А.В. Саввин⁵

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

² ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ руководитель Информационно-аналитического центра Управления ветнадзора, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁵ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Ящуром болеют свыше 100 видов животных, принадлежащих к 33 семействам и 14 отрядам. Эта болезнь может поражать домашний скот и диких животных, главным образом парнокопытных. Считается, что больные ящуром дикие животные являются резервуаром возбудителя инфекции. С другой стороны, риск возникновения ящура среди диких восприимчивых животных главным образом связан с персистенцией вируса у домашнего скота. Данный библиографический обзор посвящен изучению восприимчивости к вирусу ящура диких животных и их роли в распространении заболевания.

Ключевые слова: ящур, дикие животные.

UDC 619:616.98:578.835.2:639.111.6

SUSCEPTIBILITY TO FOOT AND MOUTH DISEASE AND ROLE OF WILD ANIMALS

V.V. Nikiforov¹, T.K. Mayorova², A.K. Karaulov³, A.N. Spiridonov⁴, A.V. Savvin⁵

¹Senior researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: nikiforov@arriah.ru

²Leading veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir

³Head, Information and Analytical Centre, Department for Veterinary Surveillance, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

⁴Junior researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir

⁵Senior researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

SUMMARY

More than 100 animal species belonging to 33 families and 14 orders suffer from foot and mouth disease (FMD). The disease can affect livestock and wild animals, particularly cloven-hoofed ones. It is widely thought that FMD-affected wild animals present a reservoir of the infection agent. On the other hand, a risk of FMD occurrence among wild susceptible animals is associated mainly with virus persistence in livestock. The given bibliographical review is devoted to the study of susceptibility of wild animals to FMD virus and their role in the disease spread.

Key words: foot and mouth disease (FMD), wild animals.

этого заболевания. Однако роль отдельных звеньев биоценоза в экологии возбудителя ящура применима к определенным географическим зонам [1].

В прежние годы, когда ящур имел широкое распространение на территории СССР, среди диких животных также отмечали это заболевание [3, 9, 19, 20]. В зонах отгонного животноводства зачастую имеет место контакт диких и домашних животных на пастбищах, при пользовании открытыми водопоями, где источником инфекции в дикой природе могут являться сайгаки, горные бараны, козлы и др. Известно, что в условиях средней полосы к вирусу ящура восприимчивы лоси, олени, косули, кабаны [5, 3, 8, 9, 10, 11, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Чувствительность восприимчивых диких животных к ящур, клиническое проявление, патологоанатомические изменения, результаты серодиагностики.

О степени чувствительности разных видов диких животных к вирусу ящура данные литературы проти-

ВВЕДЕНИЕ

Считается, что потенциальным источником инфекционных заболеваний для домашнего скота являются дикие животные. Широкий круг восприимчивых к ящур домашних и диких животных, находящихся в тесных биоценозных и экологических взаимосвязях, является одной из важных эпизоотических особенностей



Рис. Поражение конечностей у слонов при ящуре (A. Torres, USA)

воречивы, как и об их роли в эпизоотическом процессе.

В Московском зоопарке ящур впервые был констатирован в 1935 г. в популяции гаялов [7]. Вторая вспышка в 1953 г. охватила дагестанских туров, северных и пятнистых оленей, ланей, белых яков, буйволов, англопарковую корову, козерогов и бизонов. В 1958 г. также наблюдалась вспышка ящура в зубро-бизоннике.

В 1958–1959 гг. в Московском зоопарке в результате заболевания ящуром погиб весь восприимчивый молодняк и 7 взрослых животных. Клинические признаки заболевания были подтверждены вирусологическими, патологоанатомическими и патогистологическими методами исследования, источники заноса вируса не установлены [1, 7, 19].

Вспышки ящура у диких животных Московского зоопарка, таких как муфлон европейский, тур дагестанский, козерог сибирский, олень пятнистый, олень северный, изюбрь, марал, олень благородный европейский, европейская лань, лама, верблюд, в 1958 и 1959 гг. характеризовались злокачественным течением с поражением сердечной мышцы и ослаблением или отсутствием афтозных изменений, что указывает на миотропное действие вируса при одновременном некотором ослаблении его дерматропных свойств [1].

При исследовании сывороток крови в реакции нейтрализации от 5 среднеазиатских горных архаров,

отстрелянных в районах отгонных высокогорных пастбищ в 1988 г., были выявлены противоящурные антитела у 3 животных к типу О и у 2 животных – к типу А.

Экспериментальные данные по заражению северных оленей свидетельствовали о клиническом заболевании, характеризующемся появлением первичных афт с последующим процессом генерализации и развитием вторичных афт на слизистой оболочке губ и языка, а также в производящем слое копыт. Более выраженное течение наблюдалось в зимне-весенний период года, а более легкое – в летне-осенний. В опытах экспериментального заражения ящуром состояние внутренних органов оленей позволяло говорить о доброкачественном течении болезни [16].

Сотрудниками ВНИИЯИ в 1991 и 1993 гг. опубликованы результаты опытов по экспериментальному заражению лосей. В опытах использовали лосей и бычков в возрасте 1 года, часть из которых заражали вирусом ящура в язык, других содержали вместе с инфицированными животными. У больных лосей отмечали повышение температуры тела, угнетение, слабость, хромоту, снижение аппетита, слабое слюнотечение. Стоит отметить, что больные ящуром лоси заражали здоровых бычков при совместном содержании. При патологоанатомическом исследовании у лосей одновременно со слабыми ящурными изменениями в слизистой оболочке ротовой полости были установлены обширные поражения всех конечностей в области венчика, кожи межкопытцевой щели, ихорозное воспаление дистальных частей конечностей, пододрематиты, а также было отмечено миотропное действие вируса [3, 12].

В течение 1983–1995 гг. сотрудниками лаборатории эпизоотологии и патологии ВНИИЗЖ были проведены эпизоотологические и серологические обследования сельскохозяйственных животных в различных регионах СССР и России. Было исследовано свыше 10 000 проб сывороток крови из неблагополучных по ящуре регионов с установлением специфических антител к вирусу ящура более чем в 200 пробах сыворотки крови от оленей, косуль, лосей и кабанов, отобранных в 15 различных регионах. При исследовании сывороток крови бухарских оленей, полученных в 2 неблагополучных по ящуре районах Средней Азии (типы вируса О и А), в НРИФ были обнаружены постинфекционные антитела той же видовой специфичности [6, 21].

На территории Монголии из диких парнокопытных наиболее многочисленны дзерены, которые часто ми-

Таблица 1. Восприимчивость и чувствительность животных к ящуре

Зоологические классы	Восприимчивость	Чувствительность	Эпизоотологическое значение
Птицы	нет	нет	нет
Насекомоядные	+/-	+/-	нет
Хоботные	да	+/-	нет
Свиньи	да	да	возможно
Верблюдовые	да	+/-	+/-
Оленевые	да	да	возможно
Полорогие	да	да	да
Грызуны	да	да (лабораторная)	нет

Таблица 2. Виды диких животных, восприимчивых к вирусу ящура

	СЕМЕЙСТВО	НАЗВАНИЕ ВИДА ЖИВОТНОГО	ЛИТЕРАТУРНЫЕ ДАННЫЕ
	Жвачные		
ОЛЕНЕВЫЕ	Олень пятнистый	<i>Cervus nippon</i>	[1, 19, 20]
	Северный олень	<i>Rangifer tarandus</i>	[1, 14, 16, 19]
	Изюбрь	<i>Cervus elaphus</i>	[1, 7, 14]
	Марал	<i>Cervus elaphus sibiricus</i>	[1, 7, 14]
	Олень благородный европейский	<i>Cervus elaphus</i>	[1, 7, 14]
	Европейская лань	<i>Dama dama</i>	[1, 7, 14]
	Косуля европейская	<i>Capreolus capreolus</i>	[7, 14]
	Лось	<i>Alces alces</i>	[2, 3, 11, 13]
	Муфлон европейский	<i>Ovis musimon</i>	[1, 14]
	Архар	<i>Ovis ammon</i>	[1, 14]
ПОЛОРОГИЕ	Тур дагестанский (восточнокавказский)	<i>Capra cylindricornis</i>	[1, 2, 14]
	Сибирский горный козёл	<i>Capra sibirica</i>	[1, 2, 14]
	Безоаровый козел	<i>Capra aegagrus</i>	[2, 7]
	Антилопа импала	<i>Aepyceros melampus</i>	[1, 22, 23]
	Большой куду	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	[1, 21]
	Козел водяной обыкновенный	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	[1, 7]
	Антилопа болотный козел	<i>Cervicapra arundinum</i>	[1, 7]
	Черная антилопа	<i>Hippotragus niger</i>	[1, 7]
	Азиатский буйвол	<i>Bubalus bubalis</i>	[21, 43]
	Африканский буйвол	<i>Syncaerus caffer</i>	[21, 24, 31]
	Американский бизон	<i>Bison bison</i>	[28]
	Зебу	<i>Bos taurus indicus</i>	[3, 13]
	Як	<i>Poephagus grunniens</i>	[1, 14]
	Гаял (гаур)	<i>Bos frontalis</i>	[1, 7]
	Голубой гну	<i>Connochaetes taurinus</i>	[1, 7]
	Топи	<i>Damaliscus lunatus</i>	[1]
	Дзерен	<i>Gazella gutturosa (Procapra gutturosa)</i>	[2, 4, 10]
	Джейран	<i>Gazella subgutturosa</i>	[10]
	Сайгак	<i>Saiga tatarica</i>	[1, 2, 4, 10]
	ЖИРАФОВЫЕ	Жираф	<i>Giraffa camelopardalis</i>
МОЗОЛЕНОГИЕ			
ВЕРБЛЮДОВЫЕ	Одногорбый верблюд	<i>Camelus dromedarius</i>	[1, 2, 15]
	Двугорбый верблюд	<i>Camelus bactrianus</i>	[1, 15]
	Лама	<i>Lama glama</i>	[1, 15]
НЕЖВАЧНЫЕ			
ПЕКАРИЕВЫЕ	Пекари	<i>Tayassuidae</i>	[28]

	СВИНЬИ	Дикий кабан	<i>Sus scrofa</i>	[2, 3, 13, 15, 18, 32]
		Бородавочник	<i>Phacochoerus aethiopicus</i>	[1]
ХОБОТНЫЕ	СЛОНОВЫЕ	Индийский (азиатский) слон	<i>Elephas maximus</i>	[27, 28]
		Африканский слон	<i>Loxodonta africana</i>	[25, 28, 31, 23]
ГРЫЗУНЫ	БЕЛИЧЬИ	Суслик	<i>Spermophilus</i>	[17]
	ВОДОСВИНКОВЫЕ	Капибара	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	[17]
	ХОМЯКОВЫЕ	Плавающие хомяки	<i>Nectomys</i>	[29]
ЗАЙЦЕОБРАЗНЫЕ	ЗАЙЦЫ	Дикий кролик	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	[29]
НАСЕКОМОЯДНЫЕ	ЕЖОВЫЕ	Европейский еж	<i>Erinaceus europaeus</i>	[29]
СУМЧАТЫЕ	КЕНГУРОВЫЕ	Кенгуру	<i>Macropus</i>	[26, 29]
		Рыже-серый валлаби	<i>Macropus rufogriseus</i>	[29]
	ПОССУМЫ	Поссум	<i>Macropus rufogriseus</i>	[29]
	ВОМБАТЫ	Обыкновенный вомбат	<i>Vombatus ursinus</i>	[29]
	КЕНГУРОВЫЕ КРЫСЫ	Потору	<i>Potorous tridactylus</i>	[29]
	КЕНГУРОВЫЕ КРЫСЫ БАНДИКУТОВЫЕ	Бандикут	<i>Perameles nasuta</i>	[29]
	ХИЩНЫЕ СУМЧАТЫЕ	Сумчатая мышь	<i>Antechinus</i>	[29]
ОДНОПРОХОДНЫЕ	ЕХИДНЫ	Австралийская ехидна	<i>Tachyglossus aculeatus</i>	[29]

грируют. Другой вид диких парнокопытных – джейраны – встречается на территории довольно обширной гобийской части страны (полупустынная зона), а сайгаки в последние годы встречаются относительно редко. Данные Ц. Дашцэрэна свидетельствует о том, что дзереины, джейраны и сайгаки при экспериментальном заражении чувствительны к вирусу ящура, выделенному от крупного рогатого скота [4].

Наиболее восприимчивыми к вирусу ящура прежде всего считаются: крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, а также полудикие или дикие парнокопытные животные (косуля, лань, кабан, серна, зебу, як, верблюд, лама, жираф, антилопа, антилопа куду, буйвол и др.). По данным Г.П. Нуриева (1959) и С.И. Джупины (1965), при соответствующих условиях лоси, живущие на свободе, также заболевают ящуром [1, 2, 5, 11, 14].

Из результатов работ отечественных исследователей следует, что сайгаки, обитающие на территории Калмыцких степей, болели ящуром в 1957 г. (тип А), в 1958 г. (тип О) и в 1972 г. (тип А). Следует отметить, что в очагах ящура заболевание не получило широкого распространения среди сельскохозяйственных животных, т.к. они за 4–5 месяцев до вспышки были привиты противоящурной вакциной [10].

А.А. Бойко (1974) и В.Н. Сюрин (1998) отмечали, что у подозреваемых в заболевании сайгаков наблюдали угнетенное состояние, отставание от стада, учащенное дыхание, у отдельных животных – хромота. При осмотре ротовой полости у отстрелянных животных отмечены поражения в ротовой полости в виде эрозий в различной стадии эпителизации. В сыворотке крови от двух сайгаков обнаружены вируснейтрализующие антитела в титре 1,8–2,1 Ig [2, 9].

В работах сотрудников ВНИИЗЖ были обобщены результаты экспериментального заражения вирусом ящура диких кабанов и изучения клинико-анатомического проявления болезни по сравнению

с домашними свиньями. Авторы показали, что дикие кабаны оказались чувствительными к вирусу ящура как при прямом заражении, так и при совместном содержании с больными животными. Однако клинико-анатомическое проявление болезни у диких животных по сравнению с домашними свиньями было менее выражено [8, 13].

В 1976 г. Х.Л. Хубиевым было проведено исследование проб сывороток крови, полученных от диких свиней в предгорьях Закавказья. Дикие животные были убиты вблизи пастбищного массива, где ежегодно выпасались сельскохозяйственные животные, среди которых неоднократно регистрировали вспышки ящура. В пробах были обнаружены вируснейтрализующие антитела к типу А в титрах 1,67–5,5 log₂ и к типу О – в титрах 3,56–5,67 log₂ [18].

R.S Hedger и др. описали клинические признаки и симптомы при ящуре у слонов. Авторы отмечали, что клинические признаки проявлялись от нескольких дней до 3 месяцев и характеризовались отсутствием аппетита, слюнотечением, воспалением ротовой полости, появлением афт, лихорадкой, хромотой, отделением подошвы на конечностях (рис.). Кроме того, имеются сведения, что ящуром также болеют капибары и пекари [25, 28].

В опытах W.A. Snowdon было показано, что возможна вероятность передачи инфекции от крупного рогатого скота австралийским кенгуру, вомбатам и наоборот, но ни в одном из опытов не наблюдалось контактное заражение среди изучаемых австралийских млекопитающих [29].

2. Роль диких и домашних животных в эпизоотологии ящура.

Совместные исследования английских и казахских ученых показали, что риск возникновения ящура среди сайгаков главным образом связан с наличием



вирусной инфекции у домашнего скота и уже затем зависит от географического распространения инфекции, путей миграции и плотности популяций диких сайгаков. По утверждению авторов статьи, передача между дикими животными и домашним скотом таких заболеваний, как ящур, может подрывать усилия, направленные на сохранность дикой фауны, и угрожать выживаемости отдельных популяций исчезающих диких животных, в том числе сайгаков [22].

В период с 1924 по 1926 гг. во время последней вспышки ящура в США вирус от домашнего скота проник в популяцию оленей. Распространение ящура среди этих животных представляло большой риск, поскольку болезнь могла стать эндемичной. В связи с этим около 22 000 оленей были отстреляны с целью искоренения ящура, при этом у 10 % убитых животных обнаруживали типичные признаки заболевания [28].

По данным W. Schaftenaar (2002), во время вспышки ящура среди свободно живущих горных газелей в Израиле из-за высокого уровня заболеваемости и летальности погибло около 50 % всей популяции животных всех возрастных групп [28].

Американскими и австралийскими учеными исследована потенциальная роль одичавших свиней и диких оленей как резервуара ящура в дикой природе с учетом восприимчивости животных, латентного течения заболевания и последующего выздоровления на примере географических условий южного Техаса (США). При моделировании возникновения эпизоотического очага ящура было рассчитано, что неконтролируемое заболевание среди одичавших свиней спровоцирует возникновение инфекции у 698 голов крупного рогатого скота с зоной покрытия 166 км²,

а заболевание ящуром диких оленей вызовет болезнь у 1 557 голов скота с зоной покрытия 455 км² [32].

Этот литературный обзор показывает всевозможные случаи ящура в дикой природе (в т.ч. и в зоопарках), которые потенциально доказывают, что многие дикие животные могут быть восприимчивы к вирусу, а также являться источником распространения инфекции. Следует отметить, что неоднократно наблюдались случаи заболевания ящуром непарнокопытных животных, содержащихся в зоопарках, в той местности, где имела место эпизоотия среди домашнего скота. Это должно учитываться при лабораторных исследованиях различных материалов (табл. 1) [30].

На основании изученных литературных данных, в табл. 2 представлены различные виды диких животных, восприимчивых к вирусу ящура или являющихся потенциальными вирусносителями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы позволяет заключить, что, кроме отряда парнокопытных, к вирусу ящура в дикой природе восприимчивы также некоторые виды животных из отрядов насекомоядных, грызунов, сумчатых и хоботных, роль которых в распространении болезни до конца не изучена.

Кроме того, присутствует и другая проблема – угроза распространения ящура, источником которого являются сельскохозяйственные животные, в популяции диких парнокопытных, мигрирующих на огромные расстояния, что, кроме возникновения природных очагов возбудителя, может угрожать сохранности исчезающих видов.

Следует отметить, что персистенция инфекции среди диких животных не означает, что заболевание поразило домашних животных на данной территории. Тем не менее диких животных необходимо включать в систему надзора с учетом вида животного и ареала естественной миграции, так как они могут служить инфекционным резервуаром или индикатором риска по заболеваемости домашних животных ящуром.

Одним из важнейших факторов предотвращения распространения ящура является нарушение связи «домашний скот – дикая фауна», своевременная ликвидация первичных эпизоотических очагов и профилактика заболевания среди домашних животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойко А.А., Шуляк Ф.С. Роль диких животных в распространении ящура // Ящур биолого-экологич. аспект. проблемы. – М., 1971. – С. 118.
2. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.]. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
3. Восприимчивость диких и одомашненных животных к ящуру / А.М. Рахманов, А.А. Дороговцев, Ю.В. Чунаев [и др.] // К новой стратегии борьбы с ящуром.: Междунар. конф. – Владимир, 1991. – С. 22.
4. Дашцэрэн Ц., Бадарч П., Хухоров В.М. Профилактика и эффективная борьба с ящуром, а также создание высококочувствительных противоящурных вакцин // Материалы симпозиума стран-членов СЭВ. – Улан-Батор, МНР, 1981. – С. 77.
5. Джупин С.И. Ящур у лосей в условиях эксперимента // Ветеринария. – 1965. – № 5. – С. 47.
6. Жучкова Л.Г., Рахманов А.М. Диагностика ящура у диких животных с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции: научное издание // Труды 11-й Всесоюз. конф. по пат. анатомии животных. – Харьков, 1991. – С. 32.
7. Злокачественное течение ящура у диких животных Московского зоопарка / Ф.С. Шуляк, Я.Г. Сажина, В.А. Шубин [и др.] // Труды ГНКИ. – 1966. – Т. 13. – С. 287.
8. Клинико-анатомическое проявление ящура у диких кабанов / А.М. Рахманов, Т.З. Байбиков, Ю.В. Чунаев, А.А. Жучкова // Труды 11 Всесоюз. конф. по пат. анатомии животных. – Харьков, 1991. – С. 168.
9. К диагностике ящура у сайгаков / А.А. Бойко, Б.А. Кругликов, В.П. Антонюк [и др.] // Труды ГНКИ. – 1974. – Т. 20. – С. 76.
10. Локальная вспышка ящура у сайгаков / В.М. Хухоров, Х.Л. Хубиев, С.А. Цветкова [и др.] // Актуал. пробл. вет. вирусологии.: тез. докл. к конф. – Владимир, 1978. – С. 170–173.
11. Нуриев Г.П. Ящур у лосей Татарской АССР // Ученые зап. Казанского вет. ин-та. им. Н.Э. Баумана. – 1959. – Т. 74. – С. 55.
12. Рахманов А.М., Дороговец А.А., Чунаев Ю.В. Диагностика, патогенез, патоморфология и профилактика болезней с.-х. животных: материалы Всерос. науч.-метод. конф. по патолог. анатомии с.-х. животных. – Воронеж, 1993. – С. 24–25.
13. Рахманов А.М. Особенности клинико-анатомического проявления ящура у животных разных видов: научное издание // Актуал. проблемы вет. патологии и морфологии животных: Междунар. науч.-произв. конф. – Воронеж, 2006. – С. 362–367.
14. Репер Х. Ящур. – М.: Колос, 1971. – 90 с.
15. Ретроспективная диагностика ящура у диких животных / А.М. Рахманов, Л.Г. Жучкова, Б.И. Мамченко [и др.] // Проблемы патолог. и эколог. взаимосвязи

диких теплокр. и с.-х. животных.: тез. докл. I Всесоюз. конф. – М., 1988. – С. 51.

16. Смирнов Л.Я. Патологическая характеристика экспериментального ящура северных оленей // Труды ВИЭВ. – 1961. – Т. 24. – С. 93.

17. Хубиев Х.Л. Восприимчивость сусликов к экспериментальному ящуру // Актуал. пробл. вет. вирусологии.: тез. докл. конф. – Владимир, 1977. – С. 180–183.

18. Хубиев Х.Л., Саркисян Р.А., Голота Н.Д. Обнаружение противоящурных вируснейтрализующих антител в сыворотке крови диких свиней // Актуал. вопр. вет. вирусологии.: тез. докл. конф. – Владимир, 1976. – С. 188–190.

19. Эпизоотическая ситуация по везикулярным болезням диких животных на территории бывшего СССР / А.М. Рахманов, Т.З. Байбиков, А.А. Дороговцев [и др.] // Вирусные и микробные болезни животных.: сб. науч. тр. – Владимир, 1995. – С. 155.

20. Ящур / А.Н. Бурдов [и др.]. – М.: Агропроиздат, 1990. – 320 с.

21. Ящур у диких животных / В.М. Захаров, Т.З. Байбиков, А.М. Рахманов, Н.А. Яременко // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзот. и зооантропоноз. болезнями животных: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – С. 49–52.

22. Assessing risks of disease transmission between wildlife and livestock: the saiga antelope as a case study / E.R. Morgan, M. Lunderuold, G.F. Medley [et. al.] // *Biolog. Conser.* – 2006. – Vol. 131. – P. 244–254.

23. Characterization of a SAT-1 outbreak of foot-and-mouth disease in captive African buffalo (*Syncerus caffer*): Clinical symptoms, genetic characterization and phylogenetic comparison of outbreak isolates / W. Vosloo, L.-M. de Klerk, C.I. Boshoff [et. al.] // *Vet. Microbiol.* – 2007. – Vol. 120, № 3–4. – P. 226–240.

24. Emergence of a novel subgroup within the widely circulating lineage of foot-and-mouth disease virus serotype Asia-1 India / A. Sanyal, D. Hemadri, C. Tosh, S.K. Bandyopadhyay // *Research in Vet. Science.* – 2004. – Vol. 76. – P. 151–156.

25. Hedger R.S., Brooksby J. B. FMD in an Indian elephant (letter) // *Vet. Rec.* – 1976. – Vol. 99. – P. 93.

26. Identification of foot and mouth disease from a captive kangaroo in a zoological garden in India / S. Bhattacharya, R. Banerjee, A. Biswas, A. Chatterjee // *Vet. Rec.* – 2003. – Vol. 153. – P. 504–505.

27. Ramiah B. An outbreak of foot and mouth disease in elephants. *Indian // Veterinary J.* – 1935. – Vol. 12. – P. 28.

28. Schaftenaar W. Use of vaccination against foot and mouth disease in zoo animals, endangered species and exceptionally valuable animals // *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* – 2002. – Vol. 21, № 3. – P. 613–623.

29. Snowdon W.A. The susceptibility of some Australian fauna to infection with foot and mouth disease virus // *Australian J. of Experimental Biology and Medical Science.* – 1968. – Vol. 46. – P. 667–687.

30. Thomson G.R., Vosloo W., Bastos A.D.S. Foot and mouth disease in wildlife // *Virus Res.* – 2003. – Vol. 91, № 1. – P. 145–161.

31. The duration of the foot-and-mouth disease carrier state in African buffalo in the individual animal and in a free-living herd / J.B. Condy, R.S. Hedger, C. Hamblin, I.T.R. Barnett // *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* – 1985. – Vol. 8. – P. 259–265.

32. Ward M.P., Laffan S.W., Highfield L.D. The potential role of wild and feral animals as reservoirs of foot-and-mouth disease // *Prevent. Vet. Medicine.* – 2007. – Vol. 80. – P. 9–23.

УДК 619:616.98:6364:636.082.453.5:339.562

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ КАРАНТИНИРОВАНИЯ ХРЯКОВ – ДОНОРОВ СПЕРМЫ

А.С. Оганесян¹, А.К. Караулов², К.Н. Груздев³, С.А. Дудников⁴

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

² заведующий Информационно-аналитическим центром Управления Ветнадзора, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ главный эксперт по болезням свиней, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ эксперт, кандидат ветеринарных наук, доцент, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В работе рассмотрен вопрос о сроках карантинирования хряков – доноров семени. Изложено сравнение требований Таможенного союза и рекомендаций Всемирной организации здравоохранения животных по вопросу безопасного экспорта семени хряков.

Ключевые слова: болезни свиней, искусственное осеменение, карантин, ветеринарно-санитарные требования при импорте.

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее генетически ценные высокопородные животные – это источник генетического материала, от качества которого зависит рентабельность практически всей отрасли свиноводства. Наиболее удобным генетическим материалом, с точки зрения легкости обращения с ним непосредственно на фермах/репродукторах для улучшения генофонда, является семя хряков. Современная практика промышленного свиноводства в Российской Федерации немаловажно без применения искусственного осеменения [3, 7]. В этой связи технологии манипуляций с хряками-донорами, а также непосредственно с семенем являются весьма актуальными на сегодня вопросами. Однако помимо технологической стороны (содержание, кормление, методы получения семени, генетическая ценность) [5, 8] должное внимание должно уделяться и такой отдельной стороне вопроса, как биобезопасность конечного продукта (семени) для реципиентов. Животные-доноры могут явиться не только источником ценного генетического материала, но и источником многих возбудителей болезней, передающихся со спермой [9]. Существование данного риска учитывается современным племенным свиноводством, и как один из механизмов его снижения используется карантинирование доноров и тестирование их на ряд болезней [4, 6]. Таким образом, актуальным представляется вопрос о сроках карантинирования животных-доноров, от которых получена сперма, ввозимая на территорию Российской Федерации из зарубежных стран, и сопряженных с этим рисках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализовали требования Таможенного союза (ТС) на ввоз спермы хряков (изложены в главе 8 Единых ветеринарных (ветеринарно-санитарных) требований, предъявляемых к товарам, подлежащим ветеринарному контролю (надзору), утвержденных Решением Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 г. № 317, в ред. решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 04.12.2012 № 254) [10] и рекомендации Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) по отбору спермы хряков (изложены в главе 4.6 Кодекса здоровья наземных животных МЭБ, 2013 г.) [8]. Сравнение данных документов проводилось традиционным методом анализа документов с элементами контент-анализа в виде совокупности логических построений, направленных на раскрытие основного содержания. Результаты анализа требований ТС и рекомендаций МЭБ выразили графически в виде схемы и рекомендаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим требования ТС на ввоз спермы хряков и рекомендации МЭБ по отбору спермы хряков.

1. *Прежде всего, необходимо осознать, что же имеют в виду международный Кодекс МЭБ и требования ТС, когда говорится о предприятии по получению семени.*

МЭБ: Станция искусственного осеменения (СИО) – это предприятие, куда могут временно вводиться/поступать животные – доноры генетического материала для получения продукта (сперма). Принципиальная схема СИО описана в ст. 4.5.2 Кодекса и среди прочего включает 2 основных отделения: изолятор СИО для животных (где хряки тестируются и содержатся минимум 28 дней перед допуском к отбору спермы) и отдел отбора семени (где содержатся животные-доноры и отбирается сперма).

ТС: Станция искусственного осеменения – это предприятие/хозяйство, где постоянно содержатся животные – доноры генетического материала для получения продукта (сперма).

2. *Каковы требования к источнику животных-доноров?*

Рекомендации МЭБ ст. 4.6.4.

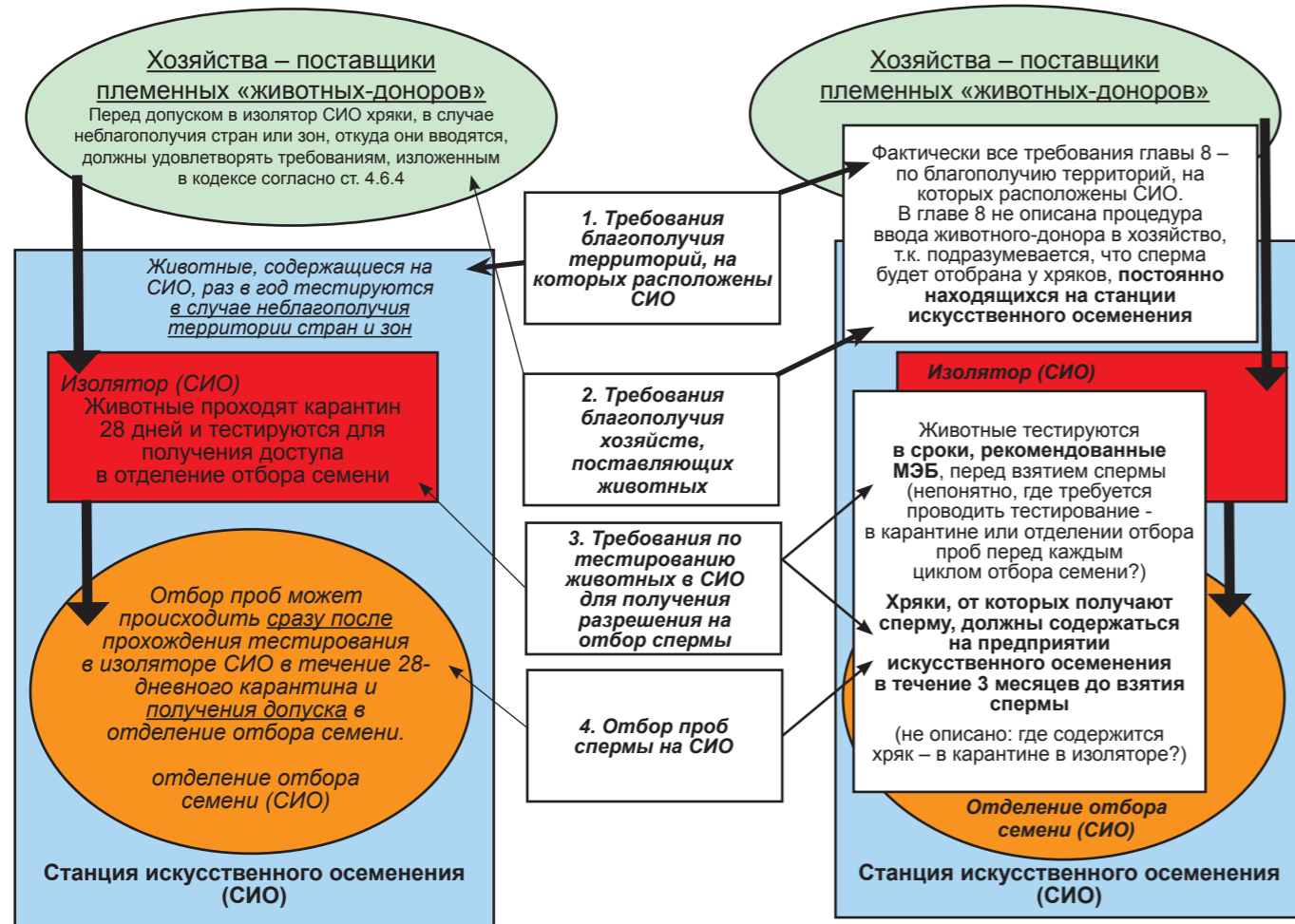


Рис. Схема требований ТС и рекомендаций МЭБ по получению спермы

МЭБ: Перед допуском в изолятор СИО животные должны происходить из благополучных по болезням стран и зон или, в случае неблагополучия стран или зон, удовлетворять следующим требованиям, изложенным в Кодексе в отношении болезней: по бруцеллезу – ст. 15.3.3, по ящуру – ст. 8.5.12-8.5.14, по болезни Ауески (БА) – ст. 8.2.9 и ст. 8.2.10, по трансмиссивному гастроэнтериту свиней (ТГС) – ст. 15.5.2, по везикулярной болезни свиней (ВБС) – ст. 15.4.5 и ст. 15.4.7, по африканской чуме свиней (АЧС) – ст. 15.1.5–15.1.6, по классической чуме свиней (КЧС) – ст. 15.2.7 и 15.2.8, по репродуктивно-респираторному синдрому свиней (PPCC) – тестирование по стандартам Руководства МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (далее – Наземного руководства) [8].

ТС: животные-доноры содержатся на предприятии постоянно (или минимум 3 месяца перед отбором семени).

3. Каковы требования к благополучию территорий стран/предприятий?

МЭБ: Животные-доноры должны быть надежно ограждены от контактов с внешней фауной. В отношении животных, в случае неблагополучия страны или зоны по нижеперечисленным болезням, раз в год проходят диагностические исследования на: бруцеллез – ст. 15.3.5, ящур – ст. 8.5.15–8.5.18, БА – ст. 8.2.12 и 8.2.14, ТГС – ст. 15.6.4, ВБС – ст. 15.4.9 и 15.4.10, АЧС – ст. 15.1.8 и 15.1.9, КЧС – ст. 15.2.8 и 15.2.9, по PPCC – прохождение

тестирования по стандартам Наземного руководства.

ТС: Сторонами допускается сперма хряков, полученная от здоровых животных в центрах отбора спермы и (или) в центрах искусственного осеменения, в которых не проводилась вакцинация животных против бруцеллеза свиней и лептоспироза. Сперма должна происходить с предприятий, расположенных на территориях, свободных от заразных болезней животных: ящур, АЧС, КЧС, ВБС. Также в хозяйствах не должно регистрироваться случаев БА, туберкулеза, бруцеллеза, PPCC, энтеровирусного энцефаломиелита свиней, лептоспироза, сибирской язвы.

4. Каковы требования по допуску животных к получению спермы?

МЭБ: Только после удовлетворения требованиям по благополучию источника происхождения хряков – доноров спермы они помещаются в изолятор СИО, где содержатся в течение минимум 28 дней перед допуском в отделение отбора семени и проходят в это время, но не ранее 21 дня после поступления в изолятор, диагностические исследования на бруцеллез, ящур, БА, ТГС, ВБС, АЧС, КЧС, PPCC.

Таким образом, при удовлетворении требований ст. 4.6.4 к благополучию территорий/хозяйств происхождения хряков-доноров и после прохождения животными карантина в изоляторе (в течение минимум 28 дней на СИО), животные поступают в отдел отбора семени СИО. Пробы спермы могут отбираться в тот же день, т.е. фактически после около 1 месяца пребывания на территории СИО. Рекомендаций о том, чтобы животные-доноры содержались какое-либо время

в отделе отбора семени СИО до взятия спермы, нет.

ТС: Хряки, от которых получают сперму, должны содержаться в центрах отбора спермы и (или) в центрах искусственного осеменения не менее 3 месяцев до взятия спермы и не использоваться в течение этого времени для естественного осеменения.

Четко не оговаривается, где должны находиться хряки до взятия семени в течение 3 месяцев – в изоляторе или в отделении отбора семени.

В сроки, рекомендованные МЭБ, перед взятием спермы хряков исследуют на КЧС, туберкулез, бруцеллез, лептоспироз, БА, ВБС, PPCC, ТГС, хламидиоз. Исследование на другие болезни, о которых подлежит уведомлению МЭБ, может быть запрошено уполномоченным органом Стороны только в случае, если на территории запрашивающей Стороны проводятся программы по профилактике и (или) искоренению этих болезней.

Исходя из приведенной схемы процедур, рекомендованных МЭБ по отбору проб, и ветеринарных требований ТС (главы 8) по экспорту в РФ спермы хряков (рис.), следует, что международные рекомендации по отбору проб спермы у хряков, изложенные в Кодексе

МЭБ (гл. 4.6) принимают/рассматривают схему введения животных на СИО, при которой минимальные сроки карантинирования животных могут составлять 28 дней. При удовлетворении требований ст. 4.6.4 к благополучию территорий/хозяйств/стад, из которых происходят хряки-доноры, для получения допуска в изолятор, после прохождения животными карантина и тестирования в изоляторе (в течение минимум 28 дней на СИО) и получения допуска животного в отдел отбора семени СИО, пробы спермы могут отбираться в тот же день, т.е. фактически после 1 месяца пребывания на территории СИО. Требования МЭБ о том, чтобы животные-доноры содержались какое-либо время в отделе отбора семени СИО до взятия спермы, нет.

Единые ветеринарные требования ТС по экспорту спермы хряков основаны на схеме, при которой животные постоянно присутствуют на СИО, и устанавливают сроки карантинирования животных на СИО 3 месяца. При этом в данной главе требований, оговаривающих введение животных на СИО для разового отбора проб семени, нет.

Со спермой хряков способны передаваться различные патогены, которые включают в себя вирусы,

Таблица. Патогены, способные распространяться со спермой свиней*

Болезнь или патоген	Присутствие патогена в сперме	Трансмиссия патогена
Ящур ¹	Да	Высокая вероятность
Везикулярная болезнь свиней ¹	Да	Да
Африканская чума свиней ¹	Да	Да
Классическая чума свиней ¹	Да	Да
Болезнь Ауески ²	Да	Высокая вероятность
Паратуберкулез ²	Да	Высокая вероятность
<i>Brucella suis</i>	Да	Да
<i>Papilloma virus</i>	Высокая вероятность	Да
Вирус PPCC	Да	Да
Аденовирус	Да	Высокая вероятность
Энтеровирус свиней	Да	Высокая вероятность
Парвовирус свиней	Да	Да
Вирус гриппа свиней	Да	Высокая вероятность
Японский энцефалит	Высокая вероятность	Да
Цирковирус свиней 2 типа	Высокая вероятность	Высокая вероятность
Вирус ТГС	Высокая вероятность	Высокая вероятность
<i>Mycoplasma sp.</i>	Высокая вероятность	Высокая вероятность
<i>Toxoplasma gondii</i>	Высокая вероятность	Высокая вероятность
<i>Actinobacillus seminis</i>	Высокая вероятность	Нет данных
<i>Rubulavirus</i>	Высокая вероятность	Нет данных
<i>Cytomegalovirus</i>	Высокая вероятность	Нет данных
Вирусная диарея KPC (<i>Pestivirus</i>)	Высокая вероятность	Нет данных

* основано на данных Т. Opriessnig et al. (2012), М. Thibier и В. Guerin (2000);

¹ болезни бывшего списка А МЭБ;

² болезни, общие для нескольких видов животных.

полноценные бактерии, хламидии и микоплазмы, а также некоторых простейших. Среди них вирусы ящура, РРСС, БА, японского энцефалита (ЯЭ), КЧС, АЧС, ВБС, парвовирусной инфекции свиней (ПВИС), гриппа свиней (ГС), ТГС, вирусного папилломатоза, цирковиринуса свиней 2 типа (ЦВС-2), аденовирусы, энтеровирусы, а также возбудители бруцеллеза свиней, микоплазмозов, хламидиоза, актинобациллеза и токсоплазмы. При этом контаминация семени возможна в трех случаях: системная инфекция донора, фекальная/респираторная контаминация во время отбора, локальная вирусная инфекция (например, поражение тестикул) [1, 3, 6, 9].

Стоит отметить, что свиньи, с высокой вероятностью, способны распространять со спермой также возбудителей таких болезней крупного рогатого скота, как паратуберкулез, чума КРС, вирусная диарея КРС [6]. Хотелось бы также отметить, что в Кодексе МЭБ отсутствуют рекомендации по тестированию спермы хряков (гл. 4.6; гл. 8.7) и доноров в отношении важного заболевания – японского энцефалита, хотя риск передачи со спермой хряков имеется [1].

Инкубационные сроки большинства инфекций перекрываются диапазоном в 1 месяц [6, 8]. Это свидетельствует о том, что серологическое тестирование по истечении 21 дня карантинирования – весьма приемлемое время для выявления серопозитивных животных, а применение прямых методов детекции возбудителей (например ПЦР) также не требует длительного времени [2, 6]. Содержание животных даже в течение 1 месяца на карантинной базе изолятора – весьма затратно с материальной точки зрения, тем более содержание их там 3 месяца. Карантинирование доноров, происходящих из благополучных источников, в течение 1 месяца с лабораторным тестированием является в эпизоотологическом смысле достаточной мерой для снижения риска распространения со спермой основных трансграничных и особо опасных болезней свиней [9].

На сегодня для свиноводства РФ поставки спермы от элитных хряков из отдельных стран Евросоюза, Канады и США – ценный источник генетического оздоровления стад. Однако практика содержания племенных животных, основанная на российской схеме-концепции функционирования племенных хозяйств, не учитывает схемы международной практики использования племенных хряков. При этом требования ввоза семени хряков в РФ основаны на внутренней практике получения спермы.

Пребывание животных-доноров в течение 3 месяцев на СИО, которые расположены на благополучных территориях по ряду вышеперечисленных болезней, и прохождение ими тестирования на ряд инфекций, безусловно, снижает риски заноса вышеуказанных возбудителей со спермой на территорию ТС. Однако данная схема больше основана на российской практике создания «племенных хозяйств», что трудно выполнимо для других стран, в которых «племенных хозяйств» как таковых может не существовать. Например, владелец элитных племенных животных привозит своих хряков с целью получения доз семени на СИО и после прохождения всех процедур по карантинированию, тестированию и отбору семени увозит их обратно в свое хозяйство. В течение 3 месяцев держать животных на СИО для владельца животных бессмысленно.

В ходе обсуждения данного вопроса не стоит забывать, что для международной торговли наиболее зна-

чимым является недопущение заноса особо опасных болезней в страну-импортер [8]. И независимо от того, какие еще патогены свиней помимо группы особо опасных/экономически значимых могут распространяться со спермой хряков, требование благополучия в отношении группы приоритетных (особо опасных) болезней (вне зависимости, рекомендованные МЭБ или изложенные в требованиях ТС) – наиболее значимый момент в поддержании биологической безопасности Российской Федерации при импортно-экспортных операциях со спермой хряков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомендации, изложенные в Кодексе МЭБ, и требования ТС при применении механизмов снижения рисков позволяют избежать вторжения на территорию стран/континентов болезней, наиболее экономически значимых в масштабе стран.

Ввиду того, что ни в требованиях ТС, ни в Кодексе МЭБ не уделено внимания инфекциям, которые являются сегодня актуальными внутрихозяйственными проблемами всего промышленного свиноводства (ПВИС, ЦВС-2, микоплазмоз, ГС [6]), существование рисков распространения их через сперму хряков, на наш взгляд, должно быть учтено непосредственно хозяйствами-импортерами при выборе конкретных хозяйств – поставщиков генетического материала и центров отбора семени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Althouse G.C., Rossow K. The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine // *Reprod. Domest. Anim.* – 2011. – № 46. – P. 64–67.
2. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative RealTime PCR technology / P.A. Van Rijn, G.J. Wellenberg, R. Hakze-van der Honing [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2004. – Vol. 120 – P. 151–160.
3. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview / D. Maes, H. Nauwynck, T. Rijsselaere [et al.] // *Theriogenology.* – 2008. – Vol. 70. – P. 1337–1345.
4. Guerin B., Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination // *Theriogenology.* – 2005. – Vol. 63. – P. 556–572.
5. Knox R.V. The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies // *Reprod. Domest. Anim.* – 2011. – № 46. – P. 4–6.
6. Opriessnig T., Giménez-Lirola L.G. Halbur P.G. Artificial Insemination and Its Role in Transmission of Swine Viruses // *A Bird's-Eye View of Vet. Med.* / ed. C.C. Perez-Marin. – 2012. – P. 255–280 – URL: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/artificial-insemination-and-its-role-in-transmission-of-swine-viruses> (дата обращения 04.06.2012 г.).
7. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations / R.J. Gerrits, J.K. Lunney, L.A. Johnson [et al.] // *Theriogenology.* – 2005. – Vol. 63. – P. 283–299.
8. *Terrestrial Animal Health. Vol. 1–2 & Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* – OIE, 2013. – URL: www.oie.int.
9. Thibier M., Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination // *Animal Reproduction Science.* – 2000. – Vol. 62. – P. 233–251.
10. www.eurasiancommission.org.

УДК 619:578.832.1:636.4:615.371

ИНАКТИВАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА СВИНЕЙ ШТАММА «A/SWINE/CALIFORNIA/07/09»

С.Г. Ремыга¹, О.Ю. Горюшев², А.А. Шевцов³

¹ младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: goryushev@arriah.ru

² ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований по выбору средств инактивации вируса гриппа свиней штамма «A/swine/California/07/09». Проведено изучение влияния различных условий на продолжительность, динамику инактивации вируса, антигенные свойства вакцин, изготовленных на основе инактивированных суспензий.

По результатам проведенных опытов был выбран наиболее оптимальный способ и режим инактивации вируса гриппа свиней с помощью β-пропиолактона, обеспечивающий быструю потерю инфекционной активности при одновременном сохранении антигенных свойств препарата.

Ключевые слова: вирус гриппа свиней, инактивация, β-пропиолактон, аминоэтил-тиленимин.

UDC 619:578.832.1:636.4:615.371

INACTIVATION OF SWINE INFLUENZA VIRUS STRAIN "A/SWINE/CALIFORNIA/07/09"

S.G. Remyga¹, O.Yu. Goryushev², A.A. Shevtsov³

¹ junior researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, E-mail: goryushev@arriah.ru

² veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir

³ leading researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir

SUMMARY

Results of testing agents for inactivation of swine influenza virus strain "A/swine/California/07/09" are given in the paper. The effect of different conditions on duration of virus inactivation, virus inactivation dynamics, antigenic properties of vaccines on the basis of inactivated suspensions was studied.

Based on the outcome of conducted experiments the most optimal method and regime of swine influenza virus inactivation using β-propiolactone providing a rapid loss of infectious activity and simultaneous maintenance of preparation antigenic properties were chosen.

Key words: swine influenza virus, inactivation, β-propiolactone, amino ethyleneimine.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус ГС инактивируют в основном для изготовления вакцин и для получения диагностических наборов. Одним из ключевых моментов получения качественного антигенного сырья является выбор инактиванта и оптимальных условий инактивации, которые позволяют полностью лишить микроорганизм инфекционной активности при сохранении антигенных и иммуногенных свойств [2].

Процесс инактивации в значительной степени зависит от метода и условий проведения реакции, чистоты вирусосодержащей суспензии, от концентрации, pH и вида инактивирующего вещества [1].

Из физических методов широко известна термоинактивация, при которой происходит повреждение вирусной ДНК или РНК, тогда как полипептиды, ответ-

ственные за иммуногенность, сохраняют свои антигенные свойства. Однако при температуре, превышающей 56 °С, происходит денатурация белков вирусного капсида, что ведет к утрате антигенной активности.

Также к этому способу инактивации относят гамма- и ультрафиолетовое облучение. Гамма-лучи – вид ионизирующего излучения, обладающий большой проникающей способностью. УФ-лучи – инактивирующая способность определяется их проникаемостью и адсорбцией биологическими молекулами [5].

Все вышеперечисленные способы и средства инактивации являются либо не слишком надежными (инактивация температурой, УФ-лучи), либо дорогостоящими средствами (гамма-лучи) [3].

Для инактивации вирусов также применяют ацетилэтиленимин (АЭИ), а чаще димер этиленimina (ДЭИ) [1, 2, 3].

Бета-пропиолактон используют для изготовления вакцин против бешенства, гриппа птиц и др., он представляет собой высокоактивный алкилирующий агент, нестойкий в водных растворах и легко гидролизуемый в течение суток при температуре 24–25 °С с образованием безвредных веществ: гидроакриловой и бета-оксипропионовой кислот [1].

Цель, которую мы преследовали при проведении данных экспериментов, это изучение динамики инактивации вируса ГС штамма «A/swine/California/07/09» наиболее распространенными, обладающими «мягким» воздействием на вирусную частицу, не оставляющими после себя «хвостов» остаточной вирулентности, инaktivантами – β-пропиолактоном и АЭИ. При испытании данных инaktivантов использовали несколько параметров для выявления оптимального количества вещества в конечной концентрации, pH, температуры и времени проведения опыта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения вирусосодержащего сырья использовали вирус ГС штамма «A/swine/California/07/09» с титром инфекционной активности не ниже 8,0 Ig ЭИД_{50/мл}. Вирус культивировали в 9–11-суточных эмбрионах СПФ-кур. Инфекционную активность очищенного вирусосодержащего материала определяли методом титрования в 9–11-суточных эмбрионах СПФ-кур. Титр инфекционной активности учитывали по методу Кербера.

Инактивация вируса. Инактивацию вируса в вирусосодержащих суспензиях проводили β-пропиолактоном и АЭИ. Для этого готовили рабочие растворы инaktivантов: из 99 % β-пропиолактона – 10 % водный раствор, а 15 % АЭИ подкисляли ледяной уксусной кислотой до необходимого значения pH. Для постановки опытов

использовали различные концентрации используемых средств, а также различные pH для АЭИ.

Вирусосодержащие суспензии и растворы инaktivантов тщательно перемешивали и выдерживали при температуре 27 и 37 °С в течение 24 ч. В процессе инактивации отбирали пробы вирусосодержащих суспензий с интервалами 6 ч и определяли их инфекционную активность титрованием в 9–11-суточных эмбрионах СПФ-кур.

Для определения полноты инактивации проводили двукратные «слепые» пассажи в развивающихся 9–11-суточных эмбрионах СПФ-кур.

Изготовление вакцин. При изготовлении опытных образцов эмульсионных вакцин использовали масляный адьювант Montanide ISA 70 фирмы SEPPIC (Франция). Антигенный компонент эмульгировали с адьювантом в соотношении 30:70 и эмульгировали в гомогенизаторе в течение 6 мин при 6000 об/мин.

Оценка антигенных свойств вакцин. Образцами вакцин иммунизировали 2,5–3-месячных подсвинков, с ревакцинацией на 21 сутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс инактивации в значительной степени зависит от условий проведения реакции, чистоты вирусосодержащей суспензии, от концентрации и вида инактивирующего вещества.

За основной период воздействия β-ПЛ и АЭИ на вирус гриппа свиней (ВГС) брали отрезок времени, равный 24 часам.

Раствор β-ПЛ (10 %) добавляли в суспензии до 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 % концентраций. Инактивацию вируса проводили при температурном режиме 37 °С и 27 °С. Результаты исследований отражены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что за испытанное время в концентрациях 0,03–0,04 % не вызывал полную утрату инфекционных свойств вируса ГС. В то же время увеличение концентрации β-ПЛ до 0,05–0,2 % резко снижало инфекционную активность вируса начиная с экспозиции в 12 ч. Из представленных данных можно определить объем антигенного материала, в котором может содержаться одна инфекционная единица: 0,2 % – 10 л, 0,1 % – 10 л, 0,05 % – 1 л.

По литературным [4] данным, β-ПЛ очень неустойчивое соединение, поэтому при 24–25 °С в течение 12 часов происходит полураспад данного соединения, а спустя 18 часов 90 % инaktivанта разрушается до безопасных составляющих.

Кроме представленных экспериментов была проведена еще одна серия опытов при тех же концентрациях β-ПЛ для воздействия на ВГС, но при другом тем-

пературном режиме – 37 °С. Результаты исследований представлены в табл. 2.

При концентрации β-ПЛ 0,03 и 0,04 % не была достигнута полная утрата инфекционных свойств вирусного материала. Начиная с 0,05 % конечной концентрации β-ПЛ, уже через 18 ч от начала опыта, материал не обладал инфекционной активностью.

Полноту инактивации вируса ГС проверяли в двукратных последовательных пассажах, гибель эмбрионов СПФ-кур не наблюдали.

При использовании в качестве инактивирующего агента АЭИ применяли температурный режим 37 °С. Наряду с различными концентрациями инaktivанта исследовали влияние pH раствора инaktivанта на динамику процесса. Результаты исследования представлены на рис. 1–3.

В ходе проведенных испытаний было установлено, что при использовании инaktivанта АЭИ в концентрации 0,1 % в период 24 часа ни при одном значении pH полной инактивации ВГС не произошло, это наихудший результат. Полная инактивация вируса за 24 часа в экстраэмбриональной жидкости была достигнута при концентрации АЭИ в 0,3 % и при всех значениях pH раствора инaktivанта. При концентрации АЭИ в 0,2 % в вирусосодержащей суспензии инактивация вируса произошла в двух из трех испытываемых значений pH исходного раствора.

Из данных рис. 1 видно, что при концентрации АЭИ в 0,1 % в период 24 ч инактивации ВГС не произошло, но образцы, не инактивированные в течение 24 ч, не обладали инфекционными свойствами спустя 36 ч с момента начала опыта, поэтому они были использованы для составления образцов вакцин по описанной выше методике.

По результатам проведенных исследований можно сделать заключение о том, что инактивация вируса ГС штамма «Калифорния/07/09» лучше протекает при значениях pH инaktivанта, близких к нейтральному значению – pH 7,5 и 6,8.

О полноте инактивации вируса ГС штамма «A/swine/California/07/09» судили по результатам двух последовательных пассажей в развивающихся эмбрионах СПФ-кур. В процессе исследования не было выявлено гибели и специфических изменений на эмбрионах, характерных для ГС.

Из вирусосодержащих суспензий, подвергнутых воздействию β-ПЛ и АЭИ, готовили образцы вакцин против ГС и изучали их антигенные свойства. Результаты представлены на рис. 4.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее высокие титры гуморальных антител (10,2 log₂)

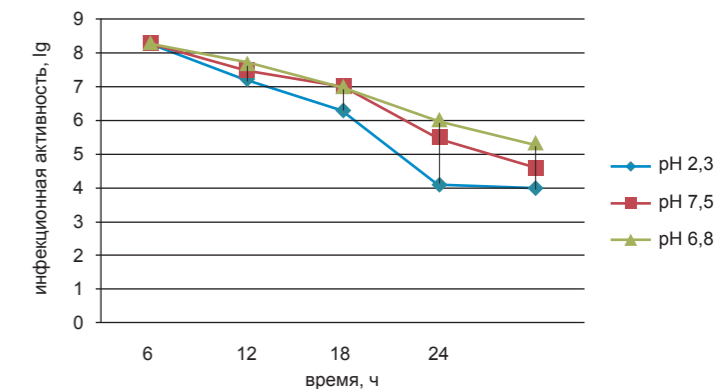


Рис. 1. Средние показатели инактивации вируса ГС после воздействия АЭИ в концентрации 0,1 %

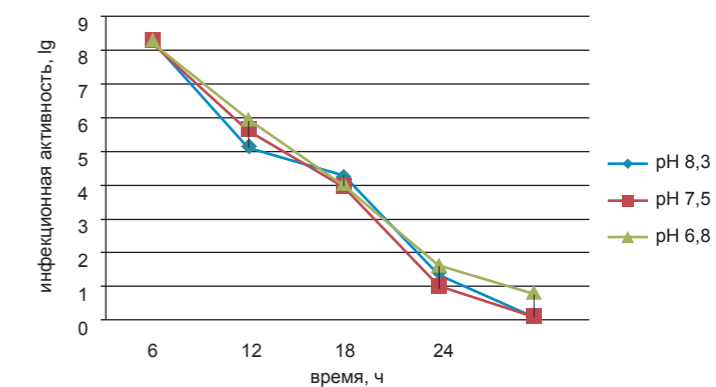


Рис. 2. Средние показатели инактивации вируса ГС после воздействия АЭИ в концентрации 0,2 %

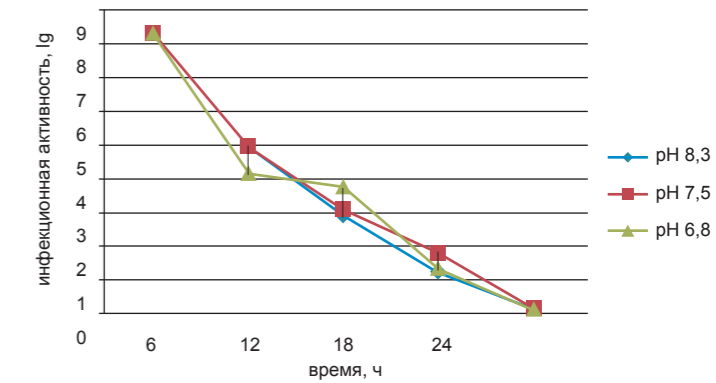


Рис. 3. Средние показатели инактивации вируса ГС после воздействия АЭИ в концентрации 0,3 %

Таблица 1. Средние показатели инфекционной активности вируса ГС штамма «Калифорния/07/09» после воздействия β-ПЛ при 27 °С (n=5)

Время, ч	Инфекционная активность вируса при концентрациях инaktivанта в суспензии, Ig ЭИД ₅₀ /см ³				
	0,03%	0,04%	0,05%	0,1%	0,2%
6	7,12±0,07*	6,04±0,07	5,44±0,08	1,24±0,12	1,3±0,1
12	6,14±0,14	4,44±0,15	2,32±0,12	–**	–
18	5,02±0,08	3,04±0,05	–	–	–
24	4,0±0,07	1,18±0,07	–	–	–

* – дано среднее значение и его стандартная ошибка;

** «–» – не обнаружено.

Примечание: инфекционная активность вируса до инактивации 8,2±0,20 Ig ЭИД₅₀/см³.

Таблица 2. Средние показатели инфекционной активности при инактивации вируса ГС штамма «Калифорния/07/09» после воздействия β-ПЛ при 37 °С (n=3)

Время, ч	Инфекционная активность вируса при концентрациях инaktivанта в суспензии, Ig ЭИД ₅₀ /см ³				
	0,03%	0,04%	0,05%	0,1%	0,2%
6	7,0±0,4*	5,6±0,24	4,7±0,24	–	–
12	6,0±0,3	4,7±0,14	1,2±0,17	–	–
18	5,0±0,1	2,0±0,24	–**	–	–
24	3,0±0,2	1,2±0,16	–	–	–

* – дано среднее значение и его стандартная ошибка;

** «–» – не обнаружено.

Примечание: инфекционная активность вируса до инактивации 8,2±0,20 Ig ЭИД₅₀/см³.

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ И АМФЕНИКОЛОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-ДМД

Н.М. Волкова¹, В.Г. Амелин², А.А. Тимофеев³, А.В. Третьяков⁴

¹ ведущий технолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: candy7000@yandex.ru

² ведущий научный сотрудник, доктор химических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ ведущий технолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ заведующий лабораторией, кандидат химических наук, доцент, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Предложен способ одновременного определения антибиотиков сульфаниламидной группы (сульфаниламид, сульфадиазин, сульфацил, сульфаметазин, сульфаквinoxалин, сульфадиметоксин, сульфаквиноксалин) и амфениколов (хлорам-, флор-, и тиамфеникола) в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием при $\lambda=228$ и 280 нм, с использованием упрощенной, быстрой и безопасной пробоподготовки QuEChERS. Пределы обнаружения антибиотиков при массе навески 5 г составили 0,02–0,4 мг/кг. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,09. Продолжительность анализа составила 1,0–1,5 ч.

Ключевые слова: сульфаниламиды, амфениколы, пищевые продукты, ВЭЖХ-ДМД.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики сульфаниламидной группы – сульфаниламид, сульфадиазин, сульфацил, сульфаметазин, сульфаквinoxалин, сульфадиметоксин сульфаквиноксалин и амфениколы (хлорам-, флор-, тиамфеникол) – часто используются в ветеринарии,

поэтому остаточные их количества могут встречаться в пищевых продуктах животного происхождения [1]. Употребление в пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, негативно сказывается на организме человека, и в связи с этим их содержание нормируется. Согласно Приложению № 21 к СанПиН 2.3.2.1078-01 РФ сумма всех остатков антибиотиков сульфаниламидной группы не должна превышать в пищевых продуктах (мясо, жир, печень, почки) 0,1 мг/кг, в молоке – 0,025 мг/кг; хлорамфеникола (ХЛФ) – 0,0003 мг/кг во всех продуктах животного происхождения; тиамфеникола – 0,05 мг/кг; сумма флорфеникола и его метаболитов в виде флорфеникола в мясе и в жире – 0,2 мг/кг, в печени – 3 мг/кг, в почках – 0,3 мг/кг (крупный и мелкий рогатый скот), в мясе – 0,3 мг/кг, в печени – 2 мг/кг, в почках, жире и коже – 0,5 мг/кг (свиньи), в мясе – 0,3 мг/кг, в печени – 2,5 мг/кг, в почках – 0,75 мг/кг, в жире и коже – 0,2 мг/кг (птица), в мясе в натуральной пропорции с кожей – 1 мг/кг (рыба прудовая и садкового содержания), в мясе – 0,1 мг/кг, в жире – 0,2 мг/кг, в печени – 2 мг/кг, в почках – 0,3 мг/кг (другие виды животных). В РФ отсутствуют нормативные документы по одновременному

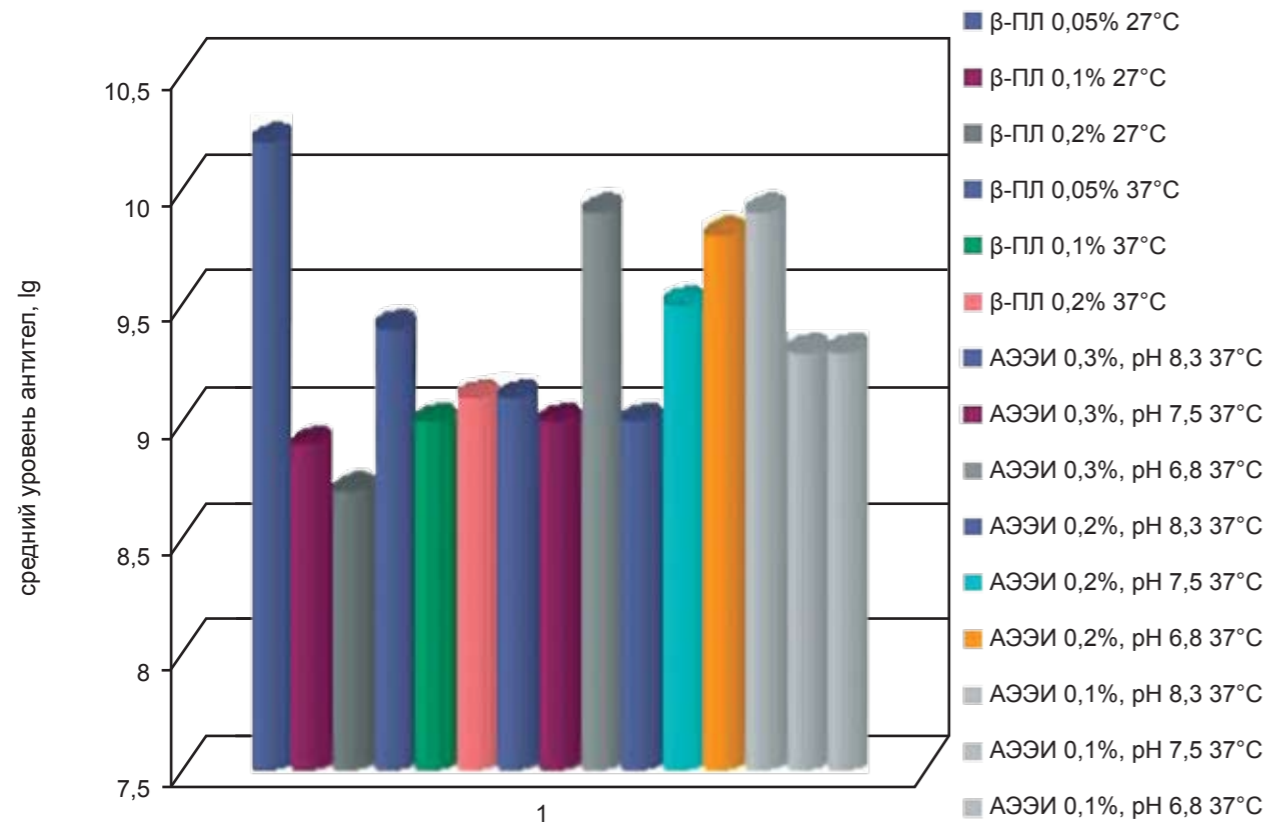


Рис. 4. Антигенные свойства образцов вакцины, приготовленных из вирусного материала после воздействия инактиваторов при различных условиях (n=3)

обнаружены у свиней, иммунизированных образцами вакцины, изготовленных из ЭЭЖ, инактивированных β -ПЛ при использовании его в конечной концентрации 0,05 % с температурным режимом 27 °С.

По совокупным результатам проведенных исследований средством выбора для инактивации ВГС является β -ПЛ. При использовании его в конечной концентрации 0,05 % с температурным режимом 27 °С были получены образцы вакцины, способствовавшей выработке у свиней наиболее высокого уровня гуморальных антител.

ВЫВОДЫ

В представленной работе показаны результаты исследований по подбору оптимальных параметров инактивации вируса гриппа свиней штамма «A/swine/California/07/09» β -пропиолактоном и АЭЭИ. Определено, что воздействие на ВГС агентов инактивации β -ПЛ и АЭЭИ в отработанных режимах позволяет получить материал, пригодный для изготовления вакцины.

По совокупным результатам проведенных исследований средством выбора для инактивации вируса ГС

штамма «A/swine/California/07/09» является β -ПЛ при использовании его в конечной концентрации 0,05 % с температурным режимом 27 °С, что позволяет получить образцы вакцины, способствующей выработке у свиней наиболее высокого уровня гуморальных антител.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. – М.: Библионика, 2007. – С. 206–223
- Cunliffe H.R. Inactivation of foot-and-mouth disease virus with ethylenimine // Appl. Microbiol. – 1973. – Vol. 26. – P. 747–750
- Graves J.H., Arlinghaus R.B. Acetylenimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines // Proc. Mtg. U.S. Livestock Sanit. Ass. – 1967. – Vol. 71. – P. 396–403.
- Gresham T. L., Jansen J. E., Shaver F. W., «J. Amer. Chem. Soc.», 1950, v. 72, p. 72–74
- Swine influenza.–URL: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/965.html>
- The H.Y., Rosenthal A.S Immunogenicity and antigen presentation in the induction of an immune response// Advances in Carriers and Adjuvantes for Veterinary Biologies. – 1986. – P. 3–9

Табл. 1. Пробоподготовка QuEChERS при определении остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах

Антибиотик	Матрица	Степень извлечения, %	Метод определения, детектор, колонка	Предел обнаружения	Предел определения	Литература
Сульфаниламиды: СДЗ, СДМ, СМЗ, СМТЗ, САМ, СПД, СТЗ	креветки	58–133	ВЭЖХ–МС (время – пролетный детектор) колонка C18 (50 mm×4,6 mm 1,8 μ m (RR Zorbax Eclipse XDB-C18)	0,06–7,00 мкг/кг		[11]
Сульфаниламиды: СДЗ, СДМ, СПД, СМО, СТЗ, СХК, СМЗ, СМТ, СХПД	мясо	25–50	ВЭЖХ–МС ВЭЖХ–МС/МС, колонка Symmetry C18 (75×4,6 mm; 3,5 μ m)		25–50 мкг/кг	[6]
Сульфаниламиды: СХК, СДМ, СТЗ, СМТ, СДЗ, СХПД	молоко, мясо, печень, кукурузный силос	10–100	СВЭЖХ–МС/МС, колонка C18 2,1×50 mm, 1,9 μ m Hypersil Gold AQ (Thermo Fisher)		0,001–0,1 мкг/г	[3]
Сульфаниламиды: СХПД, СМТП, СДЗ, СДМ, СДК, СГ, СМР, СМТ, СМО, САМ, СХК, СТЗ, ССЗ	корма	86–106	ВЭЖХ–МС/МС, колонка Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6×150 mm, 5 μ m)		0,9–7,1 мкг/кг	[2]
Амфениколы: ХЛФ, ФЛО, ТИА	молоко	86–110	ВЭЖХ–ДМД, колонка KINETEXTM 150×4,6 mm, 2,6 μ m	0,007–0,012 мкг/г	0,020–0,046 мкг/г	[8]

САМ – сульфаниламид, СДЗ – сульфадиазин, СДК – сульфадоксин, ДМ – сульфадиметоксин, СМЗ – сульфамезазин, СМО – сульфаметоксазол, СМР – сульфаметазин, СМТ – сульфаметазин, СМТЗ – сульфаметизол, СМТП – сульфаметоксипиридазин, СПД – сульфацил, ССЗ – сульфатиазол, СХК – сульфаквиноксалин, СХПД – сульфаквinoxалин, ХЛФ – хлорамфеникол, ТИА – тиамфеникол, ФЛО – флорфеникол.

Табл. 2. Структурные формулы определяемых антибиотиков

Антибиотик	Структурная формула	pKa
Сульфаниламид		3,2
Сульфадиазин		6,5
Сульфапиридин		8,4
Сульфамеразин		7,0
Сульфаклорпиридазин		5,5
Сульфадиметоксин		6,2
Сульфаквиноксалин		5,5
Хлорамфеникол		5,5
Тиамфеникол		7,2
Флорфеникол		8,6

определению остатков сульфаниламидов и амфениколов в пищевых продуктах.

В настоящее время предложено множество методов определения сульфаниламидов и амфениколов, среди которых можно выделить метод капиллярного электрофореза и методы ВЭЖХ [7, 12, 13, 14], в которых очистку экстракта проводят с использованием твердофазной экстракции [9, 16], и масс-спектрометрические методы одновременного определения остаточных количеств антибиотиков различных классов [10, 15, 17]. Первые методы связаны с использованием большого количества токсичных органических растворителей, а второй – с применением дорогостоящего, технически сложного оборудования.

С 2003 г. для быстрого извлечения пестицидов и очистки экстрактов применяют способ дисперсионной твердофазной экстракции **QuEChERS** (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – быстрый, простой, дешевый, эффективный, точный и надежный) [4]. Экстракцию целевых компонентов проводят ацетонитрилом в присутствии буферизирующих солей. Очистку

экстрактов от липидов, жиров и белков осуществляют насыщенными сорбентами Bondesil-PSA, C₁₈, графитированной сажей, ионообменными смолами и их комбинациями.

В настоящее время пробоподготовку QuEChERS используют и при определении антибиотиков (табл. 1). Однако данными методами достигаются низкие степени извлечения антибиотиков из мяса [16], высокие пределы обнаружения и определения сульфаниламидов в креветках и мясе [6, 11]. Кроме того, эти способы не дают возможности совместного определения сульфаниламидов и амфениколов.

Цель данной работы – предложить быстрый, безопасный и простой способ одновременного извлечения и определения сульфаниламидов и амфениколов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-ДМД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аппаратура. В работе использовали жидкостный хроматограф с диодно-матричным детектором Flexar DAD (Perkin-Elmer, США). Разделение проводили на колонке (250×4,6 мм) SUPELCOSIL™ LC-18 (5 мкм) (SIGMA-ALDRICH, США) в режиме градиентного элюирования подвижной фазы.

Реактивы. Использовали стандартные образцы антибиотиков: сульфаниламид (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия), сульфадиазин, сульфапиридин, сульфамеразин, сульфаклорпиридазин, сульфадиметоксин, сульфаквиноксалин (Fluka, Германия) и амфениколы (хлорам-, флор-, тиамфеникол) (Sigma, Германия). Стандартные растворы с концентрацией 10 мкг/мл готовили в ацетонитриле. Использовали ацетонитрил для хроматографии (Merck, Германия), сульфат магния, х.ч., хлорид натрия, х.ч., натрий лимоннокислый тризамещенный двойной гидрат, х.ч., натрий лимоннокислый двузамещенный полуторный гидрат, х.ч., сорбенты Bondesil-PSA (Varian, США) и C18 (Supelco, США), натрия ацетат (Dudley Chemical, Россия).

Пробоподготовка. Пробоподготовку осуществляли по методу QuEChERS [12]. Исследуемые пробы измельчали с помощью миксера. В центрифужную пробирку емкостью 50 мл вносили навеску 5,0 г, добавляли 10 мл ацетонитрила, 0,1 мл конц. муравьиной кислоты, закрывали пробирку и энергично взбалтывали в течение 1 мин. Затем вносили смесь 4,0 г – MgSO₄, 1,0 г – NaCl, 1,0 г – Na₂C₆H₅O₇·x2H₂O и 0,5 г – Na₂C₆H₅O₇·x1½ H₂O. После внесения солей взбалтывали в течение 1 мин (во избежание образования комков) и центрифугировали в течение 5 мин при 4500 об/мин, отбирали 5 мл верхней части экстракта и переносили в центрифужную пробирку емкостью 15 мл, которая содержала смесь сорбента Bondesil-PSA (0,15 г), C18 (0,15 г) и MgSO₄ (0,9 г). Пробирку энергично встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали 5 мин при 2700 об/мин, отбирали 1 мл экстракта в микрофлакон, упаривали в токе азота досуха, остаток растворяли в 100 мкл подвижной фазы и хроматографировали.

Для характеристики эффективности пробоподготовки использовали степень извлечения:

$$R = \frac{c_k V_k}{c_0 V_0} \times 100$$

где c_k и c_0 – концентрация аналита в конечном анализируемом растворе и начальная концентрация аналита в исходной пробе;
 V_k и V_0 – объем конечного анализируемого раствора-концентрата и объем пробы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и ацетатный буфер с добавлением уксусной кислоты для повышения разрешения пиков и чувствительности. Без добавления уксусной кислоты наблюдалось соразмывание для сульфапиридин/сульфамеразин и сульфадиметоксин/сульфаквиноксалин и размывание пика сульфадиазина [5]. Варьировали содержание кислоты в подвижной фазе и создавали градиент для лучшего разделения сульфаниламидов (сульфаниламида, сульфадиазина, сульфапиридина, сульфамеразина, сульфаклорпиридазина, сульфадиметоксина, сульфаквиноксалина) и амфениколов (хлорамфеникола, тиамфеникола и флорфеникола).

На рис. 1. представлена хроматограмма смеси семи сульфаниламидов и трех амфениколов, полученная в оптимальных условиях: $t=30$ °C; градиент: ацетатный буфер (20 мМ ацетат натрия, уксусная кислота до pH=5) – ацетонитрил (об.%): 15 (0–5 мин), 5 (5–7 мин), 10 (7–10 мин), 25 (10–15 мин), 40 (15–17 мин), 15 (17–19 мин), 10 (19–25 мин). Расход подвижной фазы 1,0 мл/мин, наилучшая длина волны детектирования – 280 нм для сульфаниламидов и 228 нм для амфениколов соответственно, объем вводимой пробы – 20 мкл.

Для извлечения остаточных количеств антибиотиков из пищевых продуктов и очистки экстрактов применяли способ QuEChERS. Выбор соотношения сульфата магния MgSO₄, адсорбентов Bondesil-PSA и C18 осуществляли по максимальным значениям степеней извлечения сульфаниламидов и амфениколов из реальных объектов, и они составили на 5 г пробы: MgSO₄ – 0,9 г, Bondesil-PSA и C18 по 0,15 г.

В табл. 3 показаны степени извлечения антибиотиков из различных матриц при использовании QuEChERS в оптимальных условиях. Степень извлечения в зависимости от матрицы колеблется от 64 до 100 %.

Установлено, что на хроматографические пики сульфаниламидов и амфениколов (в выбранных условиях пробоподготовки и очистки экстракта) не влияют компоненты матриц пищевых продуктов и кормов (белки, жиры, липиды и пр.) (рис. 1–3).

В табл. 4 представлены аналитические характеристики методики определения сульфаниламидов и амфениколов. Градуировочные характеристики линейны в диапазоне 0,01–5,00 мкг/мл ($R^2 \geq 0,99$) для каждого антибиотика. Пределы обнаружения рассчитаны при отношении сигнал/шум = 3, а пределы определения – при отношении сигнал/шум = 10. Пределы определения антибиотиков в пробах с учетом навески и концентрирования экстракта в 10 раз варьируются от 0,04 до 0,4 мг/кг.

Результаты анализа пищевых продуктов показали достаточно высокую точность разработанной методики, относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,09 (табл. 3, 4). В большинстве проанализированных проб не установлено присутствие остаточных количеств антибиотиков. Однако превышение содержания сульфаниламидов было обнаружено в пробах сыра. Согласно СанПиН 2.3.2.2804-10 Дополнения и изменения N 22 к СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» сумма всех остатков данной группы не должна превышать МДУ, равных для молочной продукции 0,025 мг/кг (табл. 5, рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика одновременного определения семи сульфаниламидов и трех амфениколов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-ДМД.

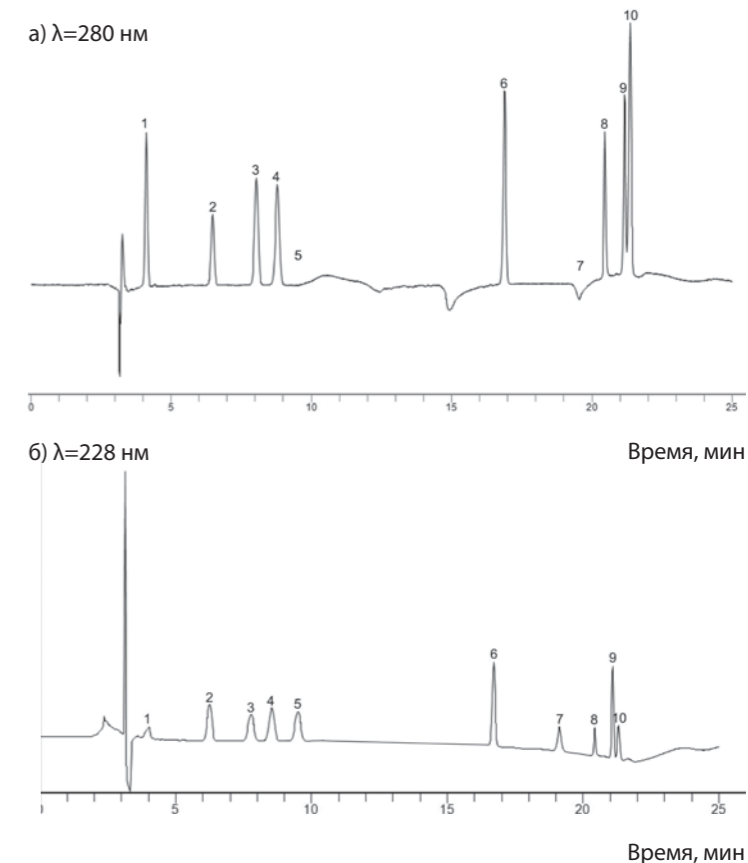


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси (5 мг/мл) сульфаниламидов и амфениколов
1 – сульфаниламид, 2 – сульфадиазин, 3 – сульфапиридин, 4 – сульфамеразин, 5 – тиамфеникол, 6 – сульфаклорпиридазин, 7 – флорфеникол, 8 – хлорамфеникол, 9 – сульфадиметоксин, 10 – сульфаквиноксалин.

Предложено использовать для извлечения антибиотиков из пищевых продуктов быстрый и безопасный прием пробоподготовки QuEChERS. Показана эффективность методики анализа реальных объектов с применением предлагаемой методики.

Табл. 3. Степени извлечения антибиотиков (в скобках указано sr) из различных матриц при использовании пробоподготовки QuEChERS (n=3, P=95)

Антибиотик	Матрица	Свинина	Молоко	Яйцо куриное
Сульфаниламид		64±4 (0,06)	72±7 (0,1)	91±8 (0,09)
Сульфадиазин		125±8 (0,06)	67±6 (0,08)	96±6 (0,07)
Сульфапиридин		64±7 (0,1)	68±4 (0,06)	84±4 (0,05)
Сульфамеразин		56±5 (0,09)	71±1 (0,02)	88±4 (0,05)
Сульфаклорпиридазин		65±6 (0,09)	71±4 (0,06)	84±4 (0,05)
Сульфадиметоксин		67±5 (0,07)	43±3 (0,07)	81±2 (0,03)
Сульфаквиноксалин		73±2 (0,03)	125±8 (0,06)	85±2 (0,03)
Хлорамфеникол		75±6 (0,08)	80±6 (0,08)	99±6 (0,06)
Тиамфеникол		56±5 (0,09)	68±4 (0,06)	84±4 (0,05)
Флорфеникол		54±5 (0,09)	64±7 (0,1)	81±2 (0,03)

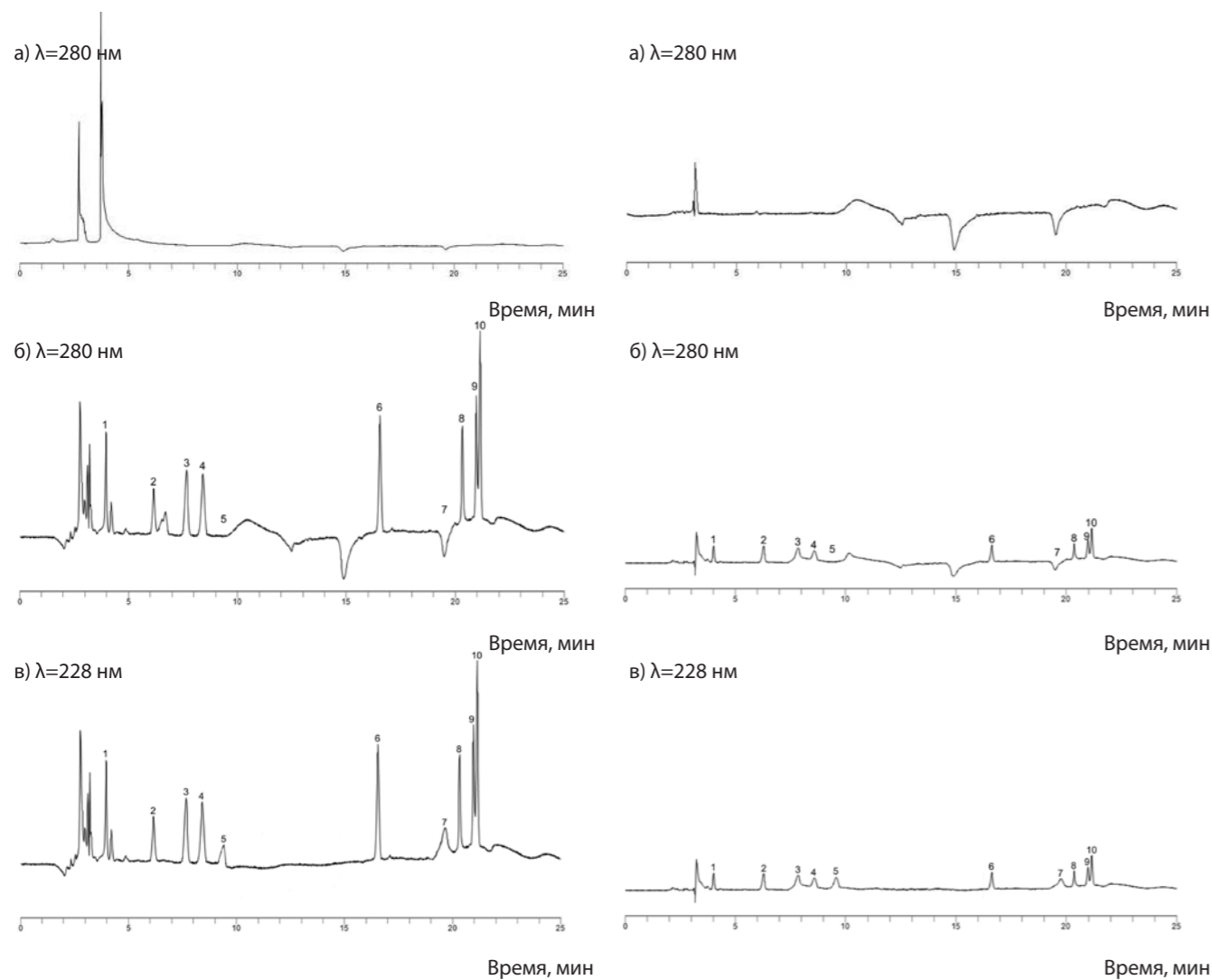


Рис. 2. Хроматограммы экстрактов проб молока без добавки (а) и с добавкой 0,5 мг/кг антибиотиков (б, в) 1 – сульфаниламид, 2 – сульфадиазин, 3 – сульфациридин, 4 – сульфамеразин, 5 – тиамфеникол, 6 – сульфаклорпиридазин, 7 – флорфеникол, 8 – хлорамфеникол, 9 – сульфадиметоксин, 10 – сульфаквиноксалин.

Рис. 3. Хроматограммы экстрактов проб свинины без добавки (а) и добавкой 0,5 мг/кг антибиотиков (б, в) 1 – сульфаниламид, 2 – сульфадиазин, 3 – сульфациридин, 4 – сульфамеразин, 5 – тиамфеникол, 6 – сульфаклорпиридазин, 7 – флорфеникол, 8 – хлорамфеникол, 9 – сульфадиметоксин, 10 – сульфаквиноксалин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2005. – С. 842–850.
2. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis Review Article / R.P. Lopes, E. Eustaquia de Freitas Passos, J. Fabiano de Alkimim Filho [et al.] // Food Control. – 2012. – Vol. 28, № 1. – P. 192–198.
3. Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry / M.S. Filigenzi, N. Ehrke, L.S. Aston [et al.] // Food Addit. Contam. – 2011. – Vol. 28. – P. 1324–1339.
4. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solidphase extraction» for the determination of pesticide residues in produce / M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbauer, F.J. Schenck // J. AOAC Int. – 2003. – Vol. 86. – P. 412–431.
5. Fuh M.R.S., Chan S.A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-

electrospray-mass spectrometry Original Research Article // Talanta. – 2001. – Vol. 55, № 6. – P. 1127–1139.

6. High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure / M.S. Bittencourt, M.T. Martinsa, F.G.S. de Albuquerque [et al.] // Food Additives and Contaminants. – 2012. – Vol. 29, № 4 – P. 508–516.
7. Hillaert S., Van den Bossche W. Optimization of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of florfenicol // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 36, № 3. – P. 437–440.
8. Karageorgou E.G., Samanidou V.F. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format // J. Separation Science. – 2011. – Vol. 34. – P. 1893–1901.
9. Malintan N.T., Mohd M.A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography // Journal of Chromatography A. – 2006. – Vol. 1127, № 1–2. – P. 154–160.

Табл. 4. Аналитические характеристики методики определения сульфаниламидов и амфениколов при диапазоне линейности градуировочной характеристики 0,01–5,00 мкг/мл (n=3, P=0,95)

Антибиотик	tR, мин	Уравнение градуировочной характеристики	R ²	Предел обнаружения, мкг/мл	Предел определения, мкг/мл	Предел определения при навеске 5 г, мг/кг
САМ	4,12	y=46512,2x	0,9996	0,005	0,01	0,02
СДЗ	6,48	y=29849,9x	0,9944	0,01	0,2	0,4
СПД	8,04	y=55460,1x	0,9999	0,01	0,01	0,2
СМР	8,79	y=55536,5x	0,9945	0,01	0,01	0,2
СХПД	16,89	y=74708,4x	0,9999	0,007	0,02	0,04
ХЛФ	20,46	y=38258,2x	0,9999	0,008	0,02	0,04
СДМ	21,16	y=90904,8x	0,9959	0,008	0,02	0,04
СХК	21,36	y=55409,1x	0,9844	0,005	0,01	0,02
ФЛО	19,07	y=54537,5x	0,9945	0,01	0,1	0,2
ТИА	9,50	y=29851,9x	0,9944	0,01	0,2	0,4

САМ – сульфаниламид, СДЗ – сульфадиазин, СДМ – сульфадиметоксин, СМР – сульфамеразин, СПД – сульфациридин, СХК – сульфаквиноксалин, СХПД – сульфаклорпиридазин, ХЛФ – хлорамфеникол, ТИА – тиамфеникол, ФЛО – флорфеникол.

Табл. 5. Сульфаниламиды в сыре

Наименование сыра	Показатель, мг/кг		Допустимые уровни мг/кг, не более
	Сульфадиазин	Сульфадиметоксин	
«Дваро»	0,11	–	0,025
«Львиное сердце»	0,05	–	
«Российский» (Украина)	–	0,05	

16. Sniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J. Determination of chloramphenicol residues in milk by gas and liquid chromatography mass spectrometry methods // Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2007. – Vol. 51. – P. 59–64.

17. Wen-Lin L., Ren-Jye L., Maw-Rong L. Supercritical fluid extraction in situ derivatization for simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in shrimp Original Research Article // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 121, № 3. – P. 797–802.

10. Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis / C. Lin, W. Lin, Y. Chen, S. Wang // Journal of Chromatography A. – 1997. – Vol. 792. – P. 37–47.

11. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry Original Research Article / M. Villar-Pulido, B. Gilbert-Lopez, J.F. Garcia-Reyes [et al.] // Talanta. – 2011. – Vol. 85, № 3. – P. 1419–1427.

12. Optimization and validation of the micellar electrokinetic capillary chromatographic method for simultaneous determination of sulfonamide and amphenicol-type drugs in poultry tissue / P. Kowalski, A. Plenis, I. Ołędzka, L. Konieczna // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2011. – Vol. 54. – P. 160–167.

13. Ricci M.C., Cross R.F. Capillary electrophoresis separation of sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors // Journal of Microcolumn Separations. – 1993. – Vol. 5, № 3. – P. 207–215.

14. Schenck F.J., Callery P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotic ICS in milk // Journal of Chromatography A. – 1998. – Vol. 812. – P. 99–109.

15. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry / B. Weiwei, Q. Zhimin, A. Craig [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1202. – P. 173–180.

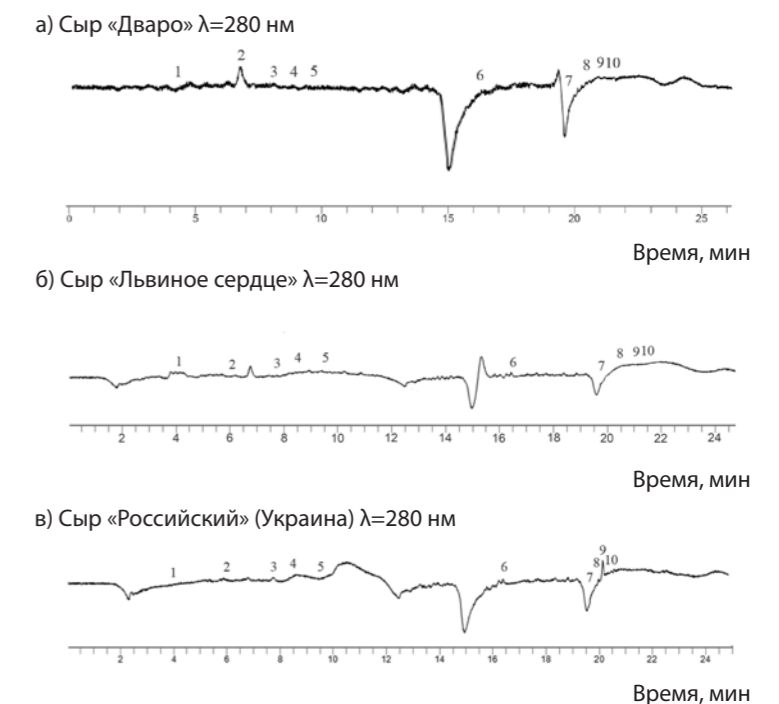


Рис. 4. Хроматограммы экстрактов проб сыра без добавки антибиотиков 1 – сульфаниламид, 2 – сульфадиазин, 3 – сульфациридин, 4 – сульфамеразин, 5 – тиамфеникол, 6 – сульфаклорпиридазин, 7 – флорфеникол, 8 – хлорамфеникол, 9 – сульфадиметоксин, 10 – сульфаквиноксалин.

SIMULTANEOUS DETECTION OF SULFANILAMIDE AND AMPHENICOL RESIDUES IN FOOD PRODUCTS BY HPLC WITH DIODE-ARRAY DETECTION

N.M. Volkova¹, V.G. Amelin², A.A. Timofeyev³, A.V. Tretyakov⁴

¹Leading Technologist, PHD student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: candy7000@yandex.ru

²Leading Researcher, Doctor of Science (Chemistry), Vladimir

³Leading Technologist, PHD student, FGBI "ARRIAH", Vladimir

⁴Head of the Laboratory, Candidate of Science (Chemistry), Associate Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir

SUMMARY

There was suggested a method of simultaneous detection of sulfanilamide antibiotics (sulfanilamide, sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline) and amphenicols (chloram-, flor-, thiamphenicol) in food products by high-performance liquid chromatography with diode-array detection at $\lambda=228$ and 280 nm, using simplified, rapid and safe sample preparation QuEChERS. Antibiotic detection limits if test portion weight is 5 g were 0.02-0.4 mg/kg. Relative standard deviation of analysis results does not exceed 0.09. Analysis duration was 1.0-1.5 h.

Key words: sulfanilamides, amphenicols, food products, HPLC with diode-array detection.

ВВЕДЕНИЕ

Sulfanilamide antibiotics—sulfanilamide, sulphadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulphachloropyridazine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and amphenicols (chloram-, flor-, thiamphenicol) are widely used in veterinary medicine that is why their residues can be

found in animal food products [1]. Consumption of food products containing antibiotic residues has an adverse effect on human health and that is why their content is regulated. According to Annex No 21 to SanPiN 2.3.2.1078-01 RF the amount of all sulfanilamide antibiotic residues should not exceed 0.1 mg/kg in food products (meat, fat, liver, kidneys), 0.025 mg/kg in milk; chloramphenicol – 0.0003 mg/kg in all animal products; thiamphenicol – 0.05 mg/kg; sum of florphenicol and its metabolites in the form of florphenicol in meat and fat – 0.2 mg/kg, in liver – 3 mg/kg, in kidneys – 0.3 mg/kg (small ruminants and cattle), in meat – 0.3 mg/kg, in liver – 2 mg/kg, in kidneys, in fat and skin – 0.5 mg/kg (pigs), in meat – 0.3 mg/kg, in liver – 2.5 mg/kg, in kidneys – 0.75 mg/kg, in fat and skin – 0.2 mg/kg (poultry), in meat and skin at equal proportions – 1 mg/kg (pond fish and cage fish), in meat – 0.1 mg/kg, in fat – 0.2 mg/kg, in liver – 2 mg/kg, in kidneys – 0.3 mg/kg (other animal species). There are no regulatory documents on simultaneous sulfanilamide and amphenicol residues in food products.

Table 1. QuEChERS sample preparation during antibiotic residue detection in food products

Antibiotic	Matrix	Extraction level %	Identification method, detector, column	Detection limit	Identification limit	Bibliography
Sulfanilamides: sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamerazine, sulfametizol, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole	shrimps	58–133	HPLC-MS (time-of-flight detector) column C18 (50 nm×4.6 nm 1.8 μ m (RR Zorbax Eclipse XDB-C18)	0,06–7,00 mkg/kg		[11]
Sulfanilamides: sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfapyridine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, sulfaquinoxaline, sulfamethazine, sulfachloropyridazine	meat	25–50	HPLC-MS HPLC-MS/MS, column Symmetry C18 (75×4.6 nm; 3.5 μ m)		25–50 mkg/kg	[6]
Sulfanilamides: sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfachloropyridazine, sulfadiazine	milk, meat, liver, corn silage	10–100	UPLC-MS/MS, column C18 2.1×50 nm, 1.9 μ m Hypersil Gold AQ (Thermo Fisher)		0,001–0,1 mkg/kg	[3]
Sulfanilamides: sulfachloropyridazine, sulfamethoxipiridazine, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulphadoxine, sg, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfanilamide, sulfaquinoxaline, sulfathiazole, sulfisoxazole	feeds	86–106	HPLC-MS/MS, column Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6×150 nm, 5 μ m)		0,9–7,1 mkg/kg	[2]
Amphenicols: chloramphenicol, florfenicol, thiamphenicol	milk	86–110	HPLC with diode-array detection, column KINETEX TM 150×4.6 nm, 2.6 μ m	0,007–0,012 mkg/kg	0,020–0,046 mkg/kg	[8]

In the present time there have been suggested many methods of sulfanilamide and amphenicol residue detection among which it is possible to single out capillary electrophoresis method and HPLC methods [7, 12, 13, 14] where extract purification is carried out using solid-phase extraction [9,16] and mass-spectrometry methods of detecting simultaneous antibiotic residues of different classes [10, 15, 17]. The first methods are associated with using a great number of toxic organic solvents and the second one with using expensive and technically complex equipment.

For rapid extraction of pesticides and extract purification a dispersive solid-phase extraction method **QuEChERS** (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) has been used since 2003 [4]. Extraction of targeted elements is conducted using acetonitrile and buffer salts. Purification of extracts from lipids, fats and proteins is carried out using free-flowing absorbents Bondesil-PSSA, C18, graphitized carbon black, ion exchange resins and their combinations.

In the present time QuEChERS sample preparation is used for antibiotic identification (Table 1). Though these methods give low levels of antibiotic extraction from meat [16] and high sulfanilamide detection and identification limits in shrimps and meat [6, 11]. Besides these methods don't allow simultaneous identification of sulfanilamides and amphenicols.

This investigation is aimed to suggest a rapid, safe and simple method of simultaneous sulfanilamide and amphenicol extraction and identification in food products using HPLC with diode-array detection.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus: Liquid chromatographer with diode-array detector Flexar DAD (Perkin-Elmer, USA). Separation was carried out on column (250×4.6 mm) SUPELCOSILTM LC-18 (5 μ m) (SIGMA-ALDRICH, USA) in gradient elution of mobile phase.

Reactives: Standard antibiotic samples were used: sulfanilamide (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany), sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine, sulfakvinoksalin (Fluka, Germany) and amphenicols (chloram-, flor-, thiamphenicol) (Sigma, Germany). Standard solutions with 10 μ g/ml were prepared in acetonitrile. Acetonitrile for chromatography (Merck, Germany), chemical grade magnesium sulfate, chemical grade sodium chloride, chemical grade tri-sodium citrate di-hydrate, chemical grade di-sodium citrate sesquihydrate, sorbents Bondesil-PSA (Varian, USA) and C18 (Supelco, USA), natrium acetat (Dudley Chemical, Russia).

Sample preparation. Sample preparation was performed according to QuEChERS method [12]. Tested samples were ground using a mixer. 5.0 g of test portion, 10 ml of acetonitrile, 0.1 ml of formic acid concentrate were added to a 50 ml centrifugal test-tube. The tube was stopped and energetically shaken for a minute. Then a mixture containing 4.0 g of $MgSO_4$, 1.0 g of -NaCl, 1.0 g - $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ and 0.5 g - $Na_2C_6H_6O_7 \cdot 1/2 H_2O$ was added. After adding salts the tube was shaken for 1 minute (to prevent lumping) and centrifuged for 5 minutes at 4500 rpm. Then 5 ml upper layer of the extract was collected and added to a 15 ml centrifugal tube, which contained a mixture of Bondesil-PSA sorbent (0.15 g), C18 (0,15 g) and $MgSO_4$ (0.9). The tube was intensively shaken for a minute and centrifuged for 5 minutes at 2700 rpm. 1 ml of extract was collected into a microvial, evaporated in

Table 2. Structural formulas of identified antibiotics

Antibiotic	Structural formula	pKa
Sulfanilamide		3,2
Sulfadiazine		6,5
Sulfapyridine		8,4
Sulfamerazine		7,0
Sulfachloropyridazine		5,5
Sulfadimethoxine		6,2
Sulfaquinoxaline		5,5
Chloramphenicol		5,5
Thiamphenicol		7,2
Florfenicol		8,6

nitrogen flow until dry, the sediment was dissolved in 100 μ l of mobile phase and chromatographed.

For sample preparation efficacy characterization the recovery rate was used:

$$R = \frac{c_k V_k}{c_0 V_0} \times 100$$

Where c_k and c_0 – analyte concentration in the final analyzed solution and primary analyte concentration in the original sample;

V_k and V_0 – volume of the final analyzed solution-concentrate and sample volume.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Acetonitrile and acetate buffer with the addition of acetic acid, to increase the peak resolution and susceptibility, were used as a mobile phase. Without the addition of

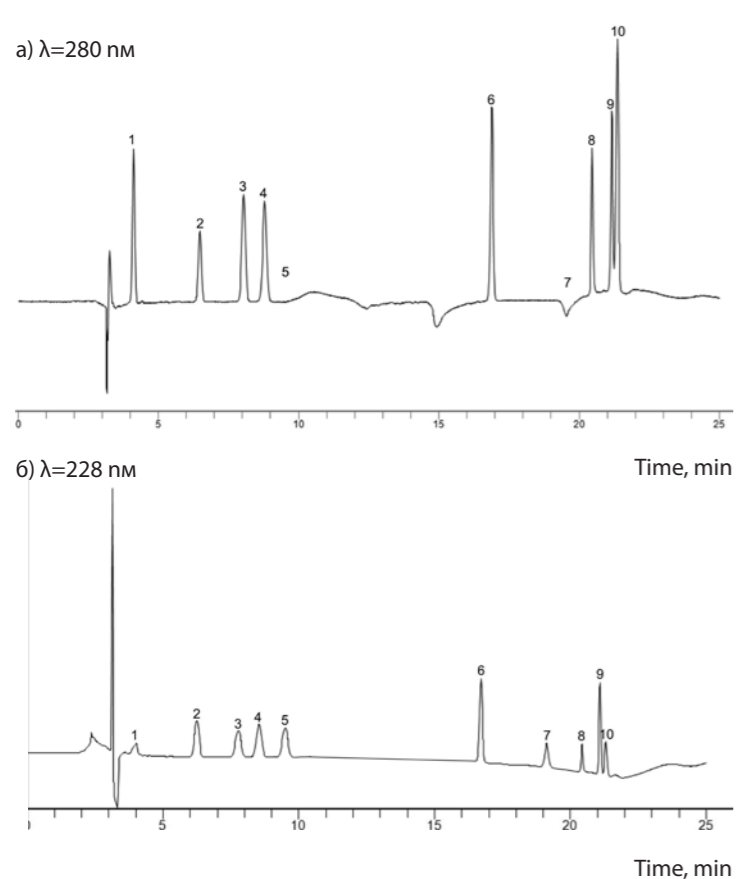


Fig. 1. Chromatography of the standard mixture (5 mg/ml) of sulfanilamides and amphenicoles
1 – sulfanilamide, 2 – sulfadiazine, 3 – sulphapyridine, 4 – sulfamerazine, 5 – thiamphenicol, 6 – sulfachloropyridazine, 7 – florfenicol, 8 – chloramphenicol, 9 – sulfadimetoxine, 10 – sulfaquinoxaline.

acetic acid a smearing of sulfapyridine/ sulfamerazine and sulfadimetoxine/ sulfaquinoxaline was observed as well as the sulfadiazine peak smearing [5]. Different amounts of acid were used in the mobile phase and the gradient was produced for the better separation of sulfanilamides

Table 3. Recovery rates of antibiotics (\bar{x} is indicated in brackets) from different matrices using QuEChERS (n=3, P=95)

Antibiotic	Matrix	Pork	Milk	Chicken egg
Sulfanilamide		64±4 (0,06)	72±7 (0,1)	91±8 (0,09)
Sulfadiazine		125±8 (0,06)	67±6 (0,08)	96±6 (0,07)
Sulfapyridine		64±7 (0,1)	68±4 (0,06)	84±4 (0,05)
Sulfamerazine		56±5 (0,09)	71±1 (0,02)	88±4 (0,05)
Sulfachloropyridazine		65±6 (0,09)	71±4 (0,06)	84±4 (0,05)
Sulfadimetoxine		67±5 (0,07)	43±3 (0,07)	81±2 (0,03)
Sulfaquinoxaline		73±2 (0,03)	125±8 (0,06)	85±2 (0,03)
Chloramphenicol		75±6 (0,08)	80±6 (0,08)	99±6 (0,06)
Thiamphenicol		56±5 (0,09)	68±4 (0,06)	84±4 (0,05)
Florfenicol		54±5 (0,09)	64±7 (0,1)	81±2 (0,03)

(sulfanilamide, sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfachloropyridazine, sulfadimetoxine, sulfaquinoxaline) and amphenicoles (chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol).

Picture 1 provides the chromatography of the mixture of seven sulfanilamides and three amphenicoles produced in optimum conditions: $t=30^{\circ}\text{C}$; gradient: acetate buffer (20 mM sodium acetat, acetic acid, up to pH=5) – acetonitrile (v %): 15 (0-5 min), 5 (5-7 min), 10 (7-10 min), 25 (10-15 min), 40 (15-17 min), 15 (17-19 min), 10 (19-25 min). Mobile phase velocity is 1.0 ml/min, the best wavelength for detection of sulfanilamides – 280 nm and for amphenicoles – 228 nm, the volume of injected sample – 20 μl .

For the antibiotic residues recovery from food products and for extract purification QuEChERS was used. MgSO_4 , adsorbents Bondesil-PSA and S18 ratio was chosen according to the maximum sulfanilamide and amphenicol recovery rates from real objects. The ratio was as follows: MgSO_4 – 0.9 g, Bondesil-PSA and S18 – 0.15 g of each per 5 g sample.

Table 3 demonstrates recovery rates of antibiotics from different matrices using QuEChERS in optimum conditions. Depending on the matrix the recovery rate varies between 64 and 100%.

It was demonstrated that food and feed matrix components (proteins, fats, lipids, etc.) do not influence sulfanilamide and amphenicol chromatography peaks (in the chosen conditions of sample preparation and extract purification) (Pic. 1-3).

Table 4 provides analytical characteristics of the sulfanilamide and amphenicol detection methods. Calibration characteristics are linear within 0.01-5.00 mg/ml ($R^2 \geq 0.99$) for each antibiotic. Limits of detection are calculated at signal/noise ratio=3, and limits of quantification at signal/noise ratio=10. Limits of antibiotic quantification in samples, taking into account test portion and extract concentration, vary within 0.04 and 0,4 mg/kg.

Food product test results showed the high accuracy of the developed method, relative standard deviation of the test results does not exceed 0.09 (Tables 3, 4). No antibiotic residues were found in the majority of the tested samples. However, sulfanilamides MAL was exceeded in cheese samples. According to SanPiN 2.3.2.2804-10 Additions and changes N 22 to SanPiN 2.3.2.1078-01 "Hygienic safety requirements and food product nutritional value" the sum of all the residues of this group must not exceed MAL, which is 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for milk products (Table 5, Picture 4).

CONCLUSION

Thus, the method of simultaneous detection of 7 sulfanilamides and 3 amphenicoles in food products using HPLC with diode array detection was developed. The fast and safe method of sample preparation QuEChERS was suggested for the antibiotic recovery from food products. The effectiveness of real object analysis method using the suggested methods was demonstrated.

REFERENCES

1. Mashkovsky M.D. Pharmaceuticals. – M.: Novaya Volna, 2005. – С. 842–850.
2. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis Review Article /

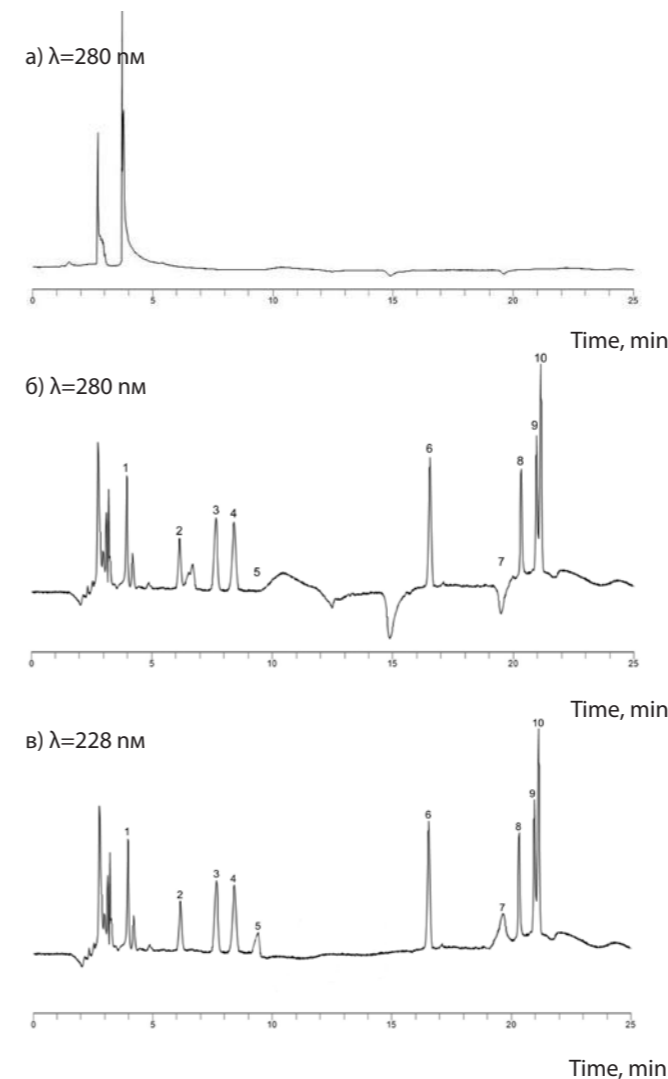


Fig. 2. Chromatograms of milk sample extracts without (a) and with 0.5 mg/kg of antibiotics (b,c)
1 – sulfanilamide, 2 – sulfadiazine, 3 – sulphapyridine, 4 – sulfamerazine, 5 – thiamphenicol, 6 – sulfachloropyridazine, 7 – florfenicol, 8 – chloramphenicol, 9 – sulfadimetoxine, 10 – sulfaquinoxaline.

Table 4. Characteristics of the sulfanilamide and amphenicol detection methods at linear range of calibration 0.01-5.00 mg/ml (n=3, P=0.95)

Antibiotic	$t_{r, \text{ min}}$	Graduation formula	R^2	Limit of detection, mg/ml	Limit of quantification, mg/ml	Limit of quantification at 5 g test portion, mg/kg
Sulfanilamide	4,12	$y=46512,2x$	0,9996	0,005	0,01	0,02
Sulfadiazine	6,48	$y=29849,9x$	0,9944	0,01	0,2	0,4
Sulfapyridine	8,04	$y=55460,1x$	0,9999	0,01	0,01	0,2
Sulfamerazine	8,79	$y=55536,5x$	0,9945	0,01	0,01	0,2
Sulfachloropyridazine	16,89	$y=74708,4x$	0,9999	0,007	0,02	0,04
Chloramphenicol	20,46	$y=38258,2x$	0,9999	0,008	0,02	0,04
Sulfadimetoxine	21,16	$y=90904,8x$	0,9959	0,008	0,02	0,04
Sulfaquinoxaline	21,36	$y=55409,1x$	0,9844	0,005	0,01	0,02
Florfenicol	19,07	$y=54537,5x$	0,9945	0,01	0,1	0,2
Thiamphenicol	9,50	$y=29851,9x$	0,9944	0,01	0,2	0,4

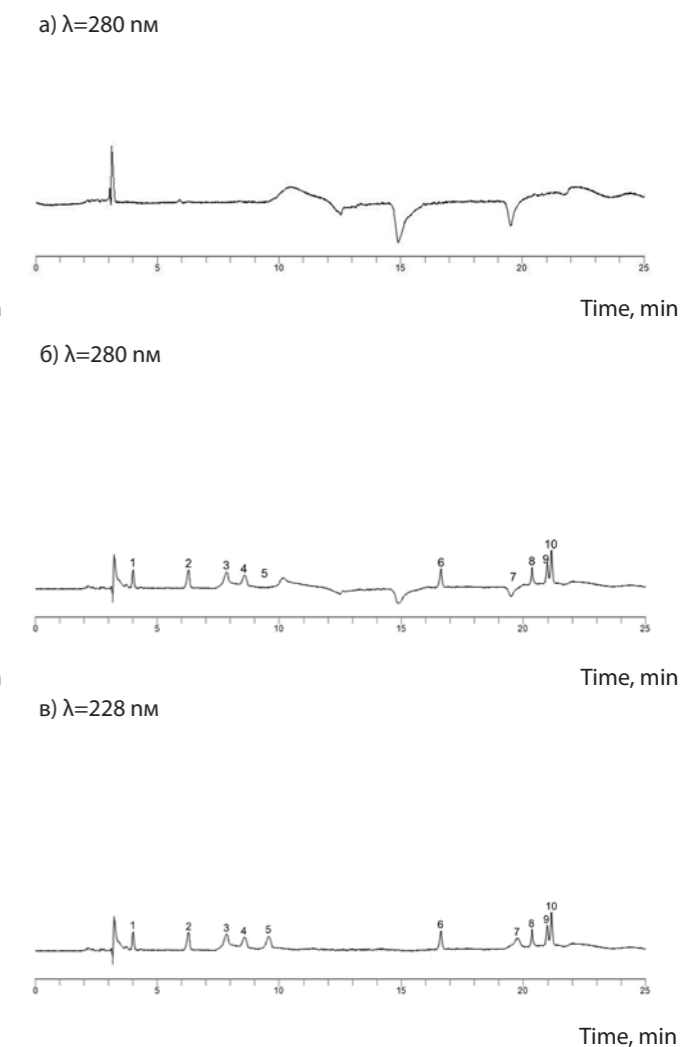


Fig. 3. Chromatograms of pork sample extracts without (a) and with 0.5 mg/kg of antibiotics (b,c)
1 – sulfanilamide, 2 – sulfadiazine, 3 – sulfapyridine, 4 – sulfamerazine, 5 – thiamphenicol, 6 – sulfachloropyridazine, 7 – florfenicol, 8 – chloramphenicol, 9 – sulfadimetoxine, 10 – sulfaquinoxaline.

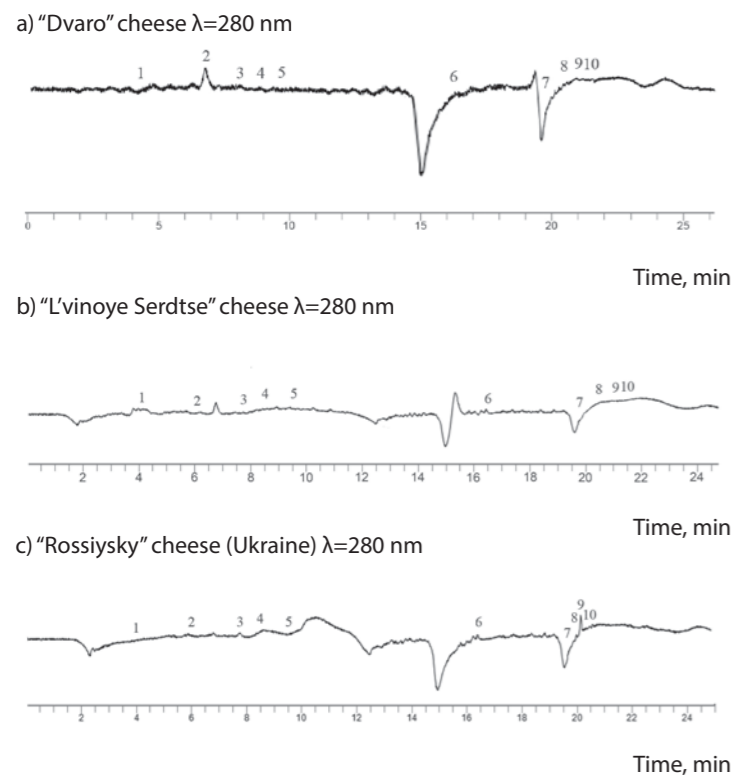


Fig. 4. Chromatograms of cheese sample extracts without antibiotics
1 – sulfanilamide, 2 – sulfadiazine, 3 – sulfapyridine, 4 – sulfamerazine,
5 – thiamphenicol, 6 – sulfachloropyridazine, 7 – florfenicol,
8 – chloramphenicol, 9 – sulfadimetoxine, 10 – sulfaquinoxaline.

Table 5. Sulfanilamides in cheese

Cheese name	Rate, mg/kg		MRLs, mk/kg
	Sulfadiazine	Sulfadimetoxine	
Dvaro	0.11	–	0.025
L'vinoye Serdtse	0.05	–	
Rossiysky Cheese (Ukraine)	–	0.05	

R.P. Lopes, E. Eustaquia de Freitas Passos, J. Fabiano de Alkimim Filho [et al.] // Food Control. – 2012. – Vol. 28, № 1. – P. 192–198.

3. Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry / M.S. Filigenzi, N. Ehrke, L.S. Aston [et al.] // Food Addit. Contam. – 2011. – Vol. 28. – P. 1324–1339.

4. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solidphase extraction» for the determination of pesticide residues in produce / M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck // J. AOAC Int. – 2003. – Vol. 86. – P. 412–431.

5. Fuh M.R.S., Chan S.A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry Original Research Article // Talanta. – 2001. – Vol. 55, № 6. – P. 1127–1139.

6. High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure / M.S. Bittencourt, M.T. Martins, F.G.S. de Albuquerque [et al.] // Food Additives and Contaminants. – 2012. – Vol. 29, № 4 – P. 508–516.

7. Hillaert S., Van den Bossche W. Optimization of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of florfenicol // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 36, № 3. – P. 437–440.

8. Karageorgou E.G., Samanidou V.F. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format // J. Separation Science. – 2011. – Vol. 34. – P. 1893–1901.

9. Malintan N.T., Mohd M.A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography // Journal of Chromatography A. – 2006. – Vol. 1127, № 1–2. – P. 154–160.

10. Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis / C. Lin, W. Lin, Y. Chen, S. Wang // Journal of Chromatography A. – 1997. – Vol. 792. – P. 37–47.

11. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry Original Research Article / M. Villar-Pulido, B. Gilbert-Lopez, J.F. Garcia-Reyes [et al.] // Talanta. – 2011. – Vol. 85, № 3. – P. 1419–1427.

12. Optimization and validation of the micellar electrokinetic capillary chromatographic method for simultaneous determination of sulfonamide and amphenicol-type drugs in poultry tissue / P. Kowalski, A. Plenis, I. Ołędzka, L. Konieczna // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2011. – Vol. 54. – P. 160–167.

13. Ricci M.C., Cross R.F. Capillary electrophoresis separation of sulphonamides and dihydrofolate reductase inhibitors // Journal of Microcolumn Separations. – 1993. – Vol. 5, № 3. – P. 207–215.

14. Schenck F.J., Callery P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotic ICS in milk // Journal of Chromatography A. – 1998. – Vol. 812. – P. 99–109.

15. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry / B. Weiwei, Q. Zhimin, A. Craig [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1202. – P. 173–180.

16. Sniegocki T., Posyniak A., Żmudzki J. Determination of chloramphenicol residues in milk by gas and liquid chromatography mass spectrometry methods // Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2007. – Vol. 51. – P. 59–64.

17. Wen-Lin L., Ren-Jye L., Maw-Rong L. Supercritical fluid extraction in situ derivatization for simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in shrimp Original Research Article // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 121, № 3. – P. 797–802.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

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

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

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

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития ветеринарной науки.



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



Обсуждение актуальных вопросов ветеринарии.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

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

*Предоставление в редакцию рукописи статей 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 ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

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

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

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

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

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

Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источник 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 и второе полугодие 2014 года. Подписной индекс издания 70460, стоимость подписки на полугодие (два номера журнала) 1520 руб. 00 коп. Подписаться на журнал можно в любом отделении «Почты России».

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

Адрес: 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec
телефон: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88

Контактное лицо: Борисова Ольга Анатольевна (тел. добавочный 22-27)
Иголкин Алексей Сергеевич (тел. добавочный 20-20)

ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»



(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

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

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



Международные статусы ФГБУ «ВНИИЗЖ»

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

Россия, 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,

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

Тел./факс: (4922) 26-38-77, 26-15-25. Тел.: (4922) 26-06-14, 26-15-12

e-mail: mail@arriah.ru; <http://www.arriah.ru>