



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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY SCIENCE
TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



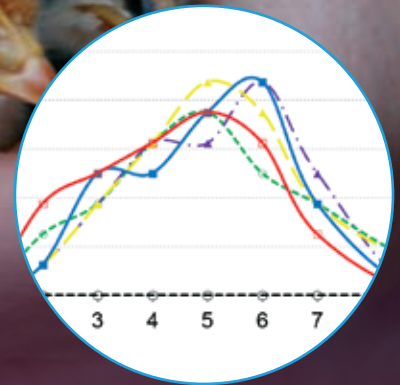
**ОПЫТ ЛИКВИДАЦИИ
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО
ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
В 2016–2017 ГГ.
с. 3**

**HISTORY OF HIGHLY PATHOGENIC
AVIAN INFLUENZA ERADICATION
IN RUSSIAN FEDERATION
IN 2016-2017
p. 8**



**КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА
РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ
ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ЧЕРЕЗ
ИНКУБАЦИОННОЕ ЯЙЦО
с. 11**

**QUALITATIVE RISK
ASSESSMENT OF AVIAN
INFLUENZA VIRUS
TRANSMISSION THROUGH
INCUBATION EGGS
p. 15**



**СРАВНЕНИЕ РЕАКТОГЕННОГО
И ИММУНОГЕННОГО
ДЕЙСТВИЯ ЖИВЫХ ВАКЦИН
ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО
ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ
с. 19**

**COMPARISON
OF REACTOGENICITY
AND IMMUNOGENICITY OF LIVE
VACCINES AGAINST INFECTIOUS
LARYNGOTRACHEITIS
p. 23**

Журнал «Ветеринария сегодня» включен
в Перечень рецензируемых научных
изданий (ВАК) по специальностям:
06.02.00 – ветеринария и зоотехния;
03.02.00 – общая биология.

Миссией издания является представление информации об основных направлениях развития ветеринарной науки и практики и привлечение внимания научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии

ЛАБОРАТОРИЯ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ

Деятельность лаборатории направлена на разработку средств и методов профилактики вирусных болезней птиц. В рамках основной задачи деятельность сотрудников лаборатории направлена на решение следующих задач:

- производство живых и инактивированных вакцин (ИББ, ИБК, ИЛТ, оспы кур, ССЯ-76, СГПК, БМ);
- проведение научных исследований. Участие в выполнении федеральных и региональных программ и проектов, разработке научных прогнозов и проведение научно-технических экспертиз;
- проведение научно-исследовательских работ, направленных на разработку опытных и опытно-промышленных технологий изготовления живых и инактивированных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита, оспы птиц, синдрома снижения яйценоскости-76, синдрома гидроперикардита кур, болезни Марека, подготовка нормативно-технической документации на вакцины и их утверждение;

- внедрение разработанных технологий изготовления живых и инактивированных вакцин в масштабное производство и осуществление контроля за соблюдением технологических процессов;
- постоянный контроль качества готового продукта с целью подтверждения соответствия требованиям нормативной документации, правильности технологических режимов, заданных при эксплуатации технологических линий по выпуску препаратов совместно с ОБТК;
- разработка комплексной системы мероприятий по профилактике и борьбе с инфекционными болезнями птиц;
- проведение патентного поиска по проблеме «Вирусные болезни птиц»;
- оказание научно-методической и практической помощи ветеринарным специалистам региональных лабораторий и птицеводческих предприятий РФ.

**Тел.: 8 (4922) 26-15-12
добавочный 23-00**

РЕФЕРЕНТНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ

ЗАДАЧИ ЛАБОРАТОРИИ:

- индикация и идентификация возбудителей карантинных и особо опасных болезней птиц;
- изучение биологических свойств возбудителей карантинных и особо опасных болезней птиц, пополнение Коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»;
- разработка и внедрение в ветеринарную практику средств и методов диагностики инфекционных болезней птиц;
- изучение иммунитета при вирусных болезнях птиц;
- подготовка научных кадров: аспирантов и соискателей, обучение специалистов, стажеров и практикантов;
- производство тест-систем для диагностики вирусных болезней птиц.

НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИИ:

- разработка и внедрение современных методов в лабораторную диагностику;
- организация и проведение межлабораторных сравнительных испытаний по наиболее значимым инфекционным болезням птиц;
- производство современных диагностических наборов;
- изучение эпизоотической ситуации по наиболее актуальным вирусным болезням птиц.

Лаборатория проводит более 75 000 исследований в год по запросам ветеринарных служб РФ и стран ближнего зарубежья (аденовирусная инфекция, ньюкасская болезнь, грипп, оспа, лейкоз, болезнь Марека, вирусный гепатит уток, вирусный энтерит, инфекционный ларинготрахеит, инфекционный бронхит, болезнь Гамборо, микоплазма, энцефаломиелит, метапневмовирусная инфекция).

**Тел.: 8 (4922) 26-15-12
добавочный 23-34**

**Главный редактор:**

Лозовой Дмитрий Анатольевич – кандидат ветеринарных наук, директор ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, тел./факс: 8 (4922) 26-15-73, e-mail: lozovoy@arriah.ru

Шеф-редактор: Юлия Мелано

Выпускающие редакторы: Ольга Лаврухина, Виктория Мишина
e-mail: vet_today@arriah.ru,
lavruhina@arriah.ru; 8 (4922) 26-15-12, доб. 22-27

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

Василевич Ф. И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ректор Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина, г. Москва



Власов Н. А. – доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, г. Москва



Груздев К. Н. – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир



Гулюкин М. И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко, г. Москва



Иголкин А. С. – кандидат ветеринарных наук, зав. лабораторией ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир



Исаева Г. С. – доктор философских наук, кандидат сельскохозяйственных наук, вице-министр Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан



Ирза В. Н. – доктор ветеринарных наук, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир



Красочко П. А. – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор Витебской государственной академии ветеринарной медицины, г. Витебск, Республика Беларусь



Лаврухина О. И. – кандидат химических наук, начальник отдела образования и научно-методической работы ФГБУ «ВНИИЗЖ» (выпускающий редактор), г. Владимир



Макаров В. В. – доктор биологических наук, профессор, академик РАЕН, РУДН, г. Москва



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



Мищенко В. А. – доктор ветеринарных наук, профессор, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир



Непоклонов Е. А. – доктор биологических наук, профессор, зам. министра сельского хозяйства РФ, г. Москва



Плющиков В. Г. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор Аграрно-технологического института РУДН, г. Москва



Прохватилова Л. Б. – кандидат биологических наук, доцент, начальник отдела координации НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир



Прунтова О. В. – доктор биологических наук, профессор, главный эксперт ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир



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



Самуйленко А. Я. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково



Сисягин П. Н. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ НИВИ НЗ России, г. Нижний Новгород



Старов С. К. – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по качеству ФГБУ «ВНИИЗЖ» (зам. глав. редактора), г. Владимир



Субботин А. М. – доктор биологических наук, профессор, помощник Президента Беларуси – инспектор по Витебской области



Шахов А. Г. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ГНУ «ВНИИВФит», г. Воронеж

Редакционный совет журнала «Ветеринария сегодня»:

Болдбаатар Базарцэрэн – доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, Улан-Батор, Монголия

Бучацкий Л. П. – доктор биологических наук, профессор, КНУ им. Тараса Шевченко, г. Киев, Украина

Гринь С. А. – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, Россия

Забережный А. Д. – доктор биологических наук, профессор, ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко, г. Москва, Россия

Ломако Ю. В. – кандидат ветеринарных наук, доцент, РУП ИЭВ им. С. Н. Вышелеского, г. Минск, Республика Беларусь

Мищенко Н. В. – доктор биологических наук, доцент, ВлГУ им. А. Г. и Н. Г. Столетовых, г. Владимир, Россия

Недосеков В. В. – доктор ветеринарных наук, профессор, Национальный универ-

ситет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина

Савченкова И. П. – доктор биологических наук, профессор, ВИЭВ им. Я. Р. Коваленко, г. Москва, Россия

Марьяна Соколович – доктор ветеринарных наук, Хорватский ветеринарный институт – Птицеводческий центр, г. Загреб, Хорватия

Сулейманов С. М. – доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Воронежский ГАУ им. императора Петра I, г. Воронеж, Россия

Чернов А. Н. – доктор биологических наук, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Россия

Эрдэнэбаатар Жанчивдорж – доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, Улан-Батор, Монголия

Дизайн и верстка: Мария Бондарь
Корректор: Анжела Дзасохова

Журнал «Ветеринария сегодня» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций, свидетельство о регистрации № Ф077-47033 от 21 марта 2012 г.

Научный журнал «Ветеринария сегодня» включен в информационно-аналитическую систему – Российский индекс научного цитирования (РИНЦ). Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU. Зарегистрированный товарный знак, свидетельство № 514190

Тираж 2000 экземпляров. Цена свободная.
Учредитель: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)
Издатель: ООО «Да Винчи Медиа», 121069, г. Москва, ул. Поварская, д. 31/29, пом. VI, комн. 13
Адрес редакции: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Типография: ООО «Юнион Принт», 603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский съезд, д. 2, тел.: (831) 439-44-99
Подписано в печать 29 марта 2018 года
Дата выхода 30.03.2018

СОДЕРЖАНИЕ

БОЛЕЗНИ ПТИЦ

- 3** М. С. Волков, В. Н. Ирза, А. В. Варкентин
ОПЫТ ЛИКВИДАЦИИ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016–2017 ГГ.
- 11** А. С. Оганесян, А. В. Варкентин, Н. Е. Баскакова, А. К. Караулов
КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ЧЕРЕЗ ИНКУБАЦИОННОЕ ЯЙЦО
- 19** С. А. Похвальный, М. С. Кукушкина, В. Ю. Кулаков, Н. В. Мороз, Н. А. Перевозчикова
СРАВНЕНИЕ РЕАКТОГЕННОГО И ИММУНОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

- 26** Е. Ю. Залюбовская
ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ НОРМИРУЕМЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В МИНЕРАЛЬНОЙ И ОРГАНИЧЕСКОЙ ФОРМАХ НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И ОБМЕН ВЕЩЕСТВ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
- 29** А. В. Кононов, А. В. Спрыгин, С. В. Кононова, А. А. Нестеров, П. В. Прутников, Е. Е. Артюхова, Е. С. Кострова, И. Н. Шумилова
ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМА ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО ДЕРМАТИТА (НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА) КРС В ПОЛЕВЫХ ОБРАЗЦАХ ОТ КРС НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
- 33** Е. В. Тяпкина, М. П. Семенов, Е. В. Кузьмина, А. А. Абрамов
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ТИОНТРИТА-S ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

CONTENTS

AVIAN DISEASES

- 8** M. S. Volkov, V. N. Irza, A. V. Varkentin
HISTORY OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA ERADICATION IN RUSSIAN FEDERATION IN 2016–2017
- 15** A. S. Oganesyanyan, A. V. Varkentin, N. Ye. Baskakova, A. K. Karaulov
QUALITATIVE RISK ASSESSMENT OF AVIAN INFLUENZA VIRUS TRANSMISSION THROUGH INCUBATION EGGS
- 23** S. A. Pokhvalny, M. S. Kukushkina, V. Yu. Kulakov, N. V. Moroz, N. A. Perevozchikova
COMPARISON OF REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF LIVE VACCINES AGAINST INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

CATTLE DISEASES

- 26** Ye. Yu. Zalyubovskaya
INFLUENCE OF FEEDING NORMALIZED TRACE ELEMENTS IN MINERAL AND ORGANIC FORM ON GROWTH, DEVELOPMENT AND METABOLISM OF YOUNG CATTLE
- 29** A. V. Kononov, A. V. Sprygyn, S. V. Kononova, A. A. Nesterov, P. V. Prutnikov, Ye. Ye. Artyukhova, Ye. S. Kostrova, I. N. Shumilova
DETECTION OF LUMPY SKIN DISEASE VIRUS GENOME IN FIELD SAMPLES COLLECTED FROM CATTLE IN THE RUSSIAN FEDERATION
- 33** Ye. V. Tyapkina, M. P. Semenenko, Ye. V. Kuzminova, A. A. Abramov
EFFICACY OF THIONTRITE-S FOR PREVENTION OF METABOLIC LIVER DISEASE IN CATTLE

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

- 37** Д. В. Шарыпова, И. Ю. Жуков, Али Мазлум, Н. Н. Власова, О. С. Пузанкова, В. Л. Гаврилова, А. С. Иголкин
ВЛИЯНИЕ ПОЛУДАНА НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСОВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА, ТРАНСМИССИВНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА И АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК
- 42** А. А. Шевцов, О. Н. Петрова, С. Г. Ремыга, А. С. Першин, К. Н. Груздев, А. С. Иголкин
АНАЛИЗ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО РЯДУ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2011–2017 ГГ.
- 49** А. А. Фунтиков, С. Р. Кременчугская, Т. К. Майорова, С. Н. Фомина, Д. А. Лозовой, В. М. Захаров
ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА О, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЮЖНОЙ КОРЕИ
- 55** М. А. Шевченко, М. Н. Гусева, Д. А. Лозовой, М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, В. В. Михалишин
ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ВНК-21/2-17 И КОЛИЧЕСТВО ИММУНОГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИРУСА ЯЩУРА

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

- 60** Е. В. Кузьмина, М. П. Семенов, Е. В. Тяпкина, В. А. Соболев
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЛЕЦИТИНА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

НОВОСТИ

- 64** О ПРОВЕДЕНИИ ФГБУ «ВНИИЗЖ» МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПТИЦ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ»

PORCINE DISEASES

- 37** D. V. Sharypova, I. Yu. Zhukov, Ali Mazlum, N. N. Vlasova, O. S. Puzankova, V. L. Gavrilova, A. S. Igolkin
POLUDANUM'S INFLUENCE ON REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME, TRANSMISSIBLE GASTROENTERITIS AND AFRICAN SWINE FEVER VIRUSES IN PRIMARY AND CONTINUOUS CELL CULTURES
- 42** A. A. Shevtsov, O. N. Petrova, S. G. Remyga, A. S. Pershin, K. N. Gruzdev, A. S. Igolkin
ANALYSIS OF LABORATORY TESTS FOR SEVERAL VIRAL SWINE DISEASES IN RUSSIA IN 2011–2017

FOOT-AND-MOUTH DISEASE

- 49** A. A. Funtikov, S. R. Kremenchugskaya, T. K. Mayorova, S. N. Fomina, D. A. Lozovoy, V. M. Zaharov
STUDYING IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FMDV TYPE O ISOLATES RECOVERED IN THE SOUTH KOREA
- 56** M. A. Shevchenko, M. N. Guseva, D. A. Lozovoy, M. I. Doronin, D. V. Mikhailishin, V. V. Mikhailishin
INFLUENCE OF CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION OF BLOOD PROTEIN HYDROLYSATE ON THE PRODUCTIVITY OF BHK-21/2-17 CELL LINEAGE AND AMOUNT OF FMDV IMMUNOGENIC COMPONENTS

GENERAL ISSUES

- 60** Ye. V. Kuzminova, M. P. Semenenko, Ye. V. Tyapkina, V. A. Soboлев
HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF LECITHIN-BASED PREPARATION ON EXPERIMENTAL ANIMAL LIVER TOXICITY



ОПЫТ ЛИКВИДАЦИИ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016–2017 ГГ.

М. С. Волков¹, В. Н. Ирза², А. В. Варкентин³

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

² Главный эксперт, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: irza@arriah.ru

³ Научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: varkentin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены эпизоотологические особенности распространения высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N8 на территории Российской Федерации, описан опыт ликвидации очагов в популяции домашних птиц, проведен анализ основных причин заноса опасного вируса в промышленные хозяйства, освещены проблемные вопросы купирования вспышек. Показаны особенности течения и клинического проявления гриппа H5N8 в сравнении с заболеванием, обусловленным подтипом H5N1. Обобщены материалы эпизоотологических расследований случаев заноса вируса на закрытые предприятия. Особое внимание уделено уничтожению павших и вынужденно убитых птиц в ходе проведения противоэпизоотических мероприятий, показана возможность альтернативных путей уничтожения биологических отходов. Определены основные риски заноса на территорию Российской Федерации «эмерджентных» подтипов вируса гриппа. С учетом текущей эпизоотической ситуации, персистенцией вируса у носителей, сохранением его жизнеспособности в окружающей среде, сезонными миграциями диких птиц ожидается дальнейшее распространение гриппа птиц на территории России. Главная угроза новых заносов возбудителя исходит из сопредельных стран Восточной Азии и Дальнего Востока (Китай, Япония, Корея), при этом возможно проникновение вирусов с зоонозным потенциалом. Не исключен риск заноса вируса из стран Европы, Ближнего Востока и Центральной Азии. Радикальные меры остаются единственным инструментом борьбы с заболеванием на сегодняшний день, а стратегия ограниченной целевой вакцинации против гриппа птиц в личных подворьях минимизирует занос вируса на промышленные предприятия в зонах риска.

Ключевые слова: высокопатогенный грипп птиц, H5N8, очаг, вспышка, противоэпизоотические мероприятия.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус высокопатогенного гриппа птиц типа А (*Influenza A virus*) устойчиво циркулирует в популяции диких перелетных птиц ряда стран, вызывает вспышки смертельного заболевания среди домашних птиц, нанося серьезный социально-экономический ущерб. Об опасности данного заболевания говорит его старое название – классическая чума птиц. Резервуаром вируса в природе являются преимущественно птицы водного и околородного экологического комплекса. Необходимо отметить, что в последние годы наблюдалась тенденция смены эпизоотического штамма: если до 2014 г. преобладал вирус подтипа H5N1, то в настоящее время получил широкое распространение вирус с антигенной формулой H5N8. Данный подтип вируса зарегистрирован в популяциях домашних и диких птиц в странах Европы, Азии и Африки. При этом все случаи нотификации данного подтипа в дикой орнитофауне связаны с регистрацией гибели пернатых, что ранее не было характерным для диких водоплавающих птиц. Видовой состав птиц, погибших от данного патогена, разнообразен:

Cygnus olor – лебедь-шипун, *Aythya ferina* – красноголовый нырок, *Aythya fuligula* – хохлатая чернеть, *Podiceps cristatus* – чомга, *Falco peregrinus* – сапсан, *Netta rufina* – красноносый нырок, *Buteo buteo* – обыкновенный канюк, *Ardea cinerea* – серая цапля, *Tachybaptus ruficollis* – малая поганка, *Haliaeetus albicilla* – орлан-белохвост, *Streptopelia decaocto* – кольчатая горлица, *Anser anser* – серый гусь, *Accipiter nisus* – ястреб-перепелятник, *Falco vespertinus* – кобчик, *Accipiter gentilis* – ястреб-тетеревятник, *Anas penelope* – свиязь, *Gallinula chloropus* – камышица, *Cygnus cygnus* – лебедь-кликун; *Tyto alba* – обыкновенная сипуха, *Branta canadensis* – канадская казарка, *Anser albifrons* – белолобый гусь; птицы из семейства чайковых – *Laridae*, врановых – *Corvidae*, аистовых – *Ciconiidae* и цесарковых – *Numididae* [8]. В Российской Федерации вирус высокопатогенного гриппа H5N8 первоначально был выделен от павших диких птиц в ходе активного мониторинга гриппа птиц в период весенней миграции на оз. Убсу-Нур в Республике Тыва. Впоследствии он стал циркулировать среди сельскохозяйственных птиц.



Рис. 1. Выраженный цианоз лап у кур при гриппе H5N1

Fig. 1. Severe cyanosis of claws of H5N1 influenza diseased chicken

В конце 2016 и начале 2017 г. эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц на территории Российской Федерации резко ухудшилась. Вспышки гриппа в популяции птиц сельскохозяйственного назначения были связаны с вирусом нового для России генотипа – 2.3.4. Так, с конца 2016 г. случаи гриппа H5N8 среди домашних птиц зарегистрированы в Астраханской, Ростовской, Московской, Нижегородской, Самарской областях, Краснодарском крае, Республиках Татарстан, Марий Эл, Калмыкия, Удмуртской и Чеченской Республиках. Вспышки карантинной инфекции нанесли огромный экономический ущерб промышленным хозяйствам Астраханской, Ростовской, Московской областей, Республики Татарстан. Вирусом были поражены куры, цесарки, гуси, утки, индейки.

Миграционные процессы у диких птиц являются одним из ключевых факторов, которые объективно влияют на развитие эпизоотической ситуации по гриппу птиц, а вследствие невозможности контроля дикой авифауны возникновения новых случаев заболевания исключить нельзя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали общепринятые методы эпизоотологического исследования. Полученные в ходе

Рис. 2. Общее угнетение

Fig. 2. General depression



исследования данные систематизировали и подвергали эпизоотологическому анализу. Вскрытие трупов, отбор проб и транспортировку патологических материалов проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»; СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности»; Ветеринарными правилами лабораторной диагностики гриппа А птиц, утвержденными приказом Минсельхоза РФ от 3 апреля 2006 г. № 105.

Первоначальный диагноз устанавливали в лабораториях субъекта РФ, подтверждающий – в ФГБУ «ВНИИЗЖ». При осмотре объектов птицеводческих организаций использовали средства фото- и видеосъемки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распространение высокопатогенного гриппа птиц H5N8. В конце 2016 – начале 2017 г. наблюдалось широкое распространение вируса высокопатогенного гриппа H5N8 среди домашних и диких птиц. Вирус гриппа был занесен на крупные промышленные птицеводческие предприятия Астраханской, Московской, Ростовской областей и Республики Татарстан. В результате противоэпизоотических мероприятий было уничтожено 2 592 019 голов промышленных птиц, что составило 0,57% от общего поголовья пернатых сельскохозяйственных предприятий по России. Кроме того, грипп данного субтипа с конца 2016 г. по настоящее время был зарегистрирован в личных подсобных (ЛПХ) и мелких крестьянских (МКХ) хозяйствах граждан Краснодарского края, Республик Калмыкия, Татарстан, Марий Эл, Удмуртской и Чеченской Республик, Московской, Самарской и Нижегородской областей. Количество уничтоженных в ЛПХ и МКХ птиц составило 9513 голов – 0,009% от поголовья птиц в российских хозяйствах данных категорий. Общее количество птиц, уничтоженных в ходе противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех категорий, составило 2 601 532 головы.

Клинические и патологоанатомические признаки гриппа H5N8. Сбор анамнестических данных в результате эпизоотологического расследования случаев заноса вируса высокопатогенного гриппа H5N8 в популяцию домашних птиц, в том числе и на промышленные предприятия закрытого типа, показал, что видимых патогномичных признаков заболевания, характерных для гриппа, на ранних стадиях установить не удается ввиду сверхострого течения заболевания. Если у птиц, заболевших гриппом, обусловленным вирусом А/H5N1, клиническая картина характеризовалась цианозом гребня, бородак, лап, которые приобретали фиолетовый цвет (рис. 1), то грипп, вызванный вирусом H5N8, протекал стремительнее, птица резко отказывалась от воды и корма, впадала в «коматозное» состояние и через несколько часов гибла (рис. 2). Установить период заражения птицы в данном случае бывает сложно из-за короткого инкубационного периода болезни. При вскрытии павших от гриппа H5N8 птиц часто выявляли следующие патологоанатомические изменения: точечные кровоизлияния на абдоминальном жире, серозных покровах (рис. 3–5); острый панкреатит (отмечали отечность поджелудочной железы, рыхлость ее структуры и неравномерность окраски, паренхима легко рвалась, сосуды были кровенаполнены) (рис. 6, 7); спленомега-



Рис. 3. Точечные кровоизлияния на абдоминальном жире у кур

Fig. 3. Petechiae in abdominal fat of chickens

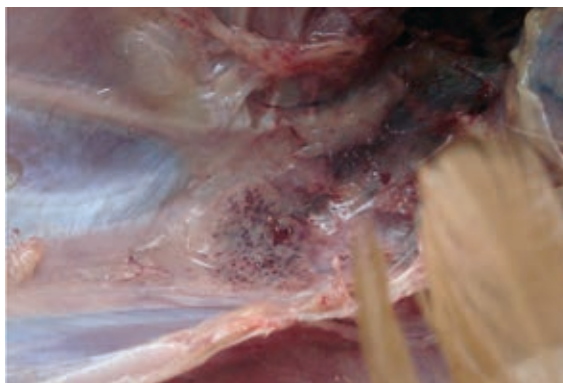


Рис. 4. Кровоизлияния на серозных покровах (погибшие куры)

Fig. 4. Hemorrhages on serous membranes (dead chickens)



Рис. 5. Кровоизлияния на внутренней стороне грудной полости у павших кур

Fig. 5. Hemorrhages on the inner side of chest cavity of dead chicken



Рис. 6. Острый панкреатит, дуоденит

Fig. 6. Acute pancreatitis, duodenitis (turkey)

лию (селезенка была увеличена в объеме, имела неоднородный точечный рисунок, дряблую структуру с обильным соскобом) (рис. 8); дуоденит и энтерит (слизистая тонкого отдела кишечника была неравномерно гиперемирована, отечна, в просвете наблюдали слизистый экссудат, сосуды серозной оболочки были кровенаполнены); гепатоз (печень была увеличена в объеме, дряблой консистенции, глинистого цвета с неравномерной окраской, легко рвалась, на разрезе имела выраженный соскоб); точечные кровоизлияния и выраженную кровенаполненность сосудов в органах

репродуктивного тракта (рис. 9). В некоторых случаях наблюдали внутренние кровотечения.

Причины заноса вируса гриппа на территорию закрытых птицеводческих предприятий. Основной механизм проникновения вируса в хозяйства закрытого типа связан с наличием слабых мест в системе биологической безопасности предприятия. Как показывает опыт, основными причинами нарушения системы биозащиты являются: невыполнение ветеринарно-санитарного режима сотрудниками хозяйств, отсутствие термической обработки кормов, доступ синантропной

Рис. 7. Острый дуоденит, панкреатит (куры)

Fig. 7. Acute duodenitis, pancreatitis (chickens)



Рис. 8. Сплениит (куры)

Fig. 8. Splenitis (chickens)



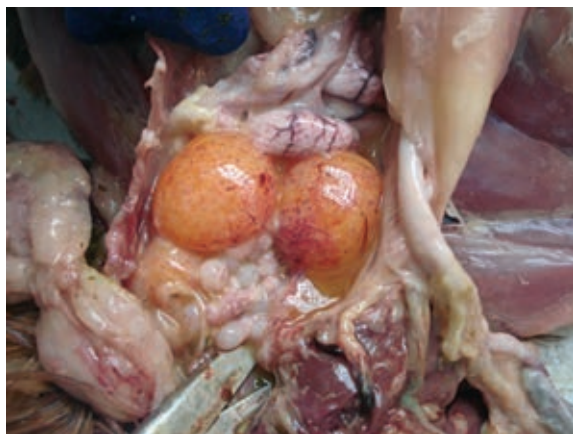


Рис. 9. Полнокровие сосудов и кровоизлияния в репродуктивном тракте у павших кур

Fig. 9. Plethora and hemorrhages in reproductive organs of dead chickens

и дикой птицы к кормовой базе предприятия и контаминация комбикорма их экскрементами, отсутствие дезинфекции используемого транспорта, недостаточность знаний по обеспечению биозащиты у работников предприятий, отсутствие действующих санитарных пропускников, пренебрежение межцикловыми профилактическими перерывами и некоторые другие. Как известно, естественным резервуаром вируса гриппа птиц в природе и бессимптомными переносчиками являются дикие водоплавающие птицы, совершающие миграции на огромные расстояния и поддерживающие циркуляцию вируса и его существование как биологического вида [5]. Синантропная птица может служить своеобразным вектором переноса вируса от диких птиц в популяцию домашних. Фекально-оральный путь передачи инфекции способствует интенсивному распространению вируса, так как патоген выделяется с пометом инфицированных птиц в высоких концентрациях. Использование контаминированного корма, загрязненной фекалиями диких птиц подстилки – преобладающие факторы заноса вируса на предприятие. Так, использование в качестве подстилки лузги семян подсолнечника, загрязненной экскрементами диких и синантропных птиц, – одна из вероятных причин первоначального заноса вируса на одно из промышленных предприятий юга России. Наличие в ЛПХ работников предприятий домашней птицы может также стать фактором заноса вируса на птицефабрику.

С целью минимизации рисков заноса патогенов в хозяйства в Российской Федерации действуют Ветеринарные правила содержания птиц на птицеводческих предприятиях закрытого типа (птицефабриках), утвержденные приказом Минсельхоза РФ от 3 апреля 2006 г. № 104, которые являются обязательными для организаций, осуществляющих выращивание и разведение птицы [2].

Противоэпизоотические мероприятия при ликвидации очагов высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации проводят в соответствии с Правилами по борьбе с гриппом птиц, утвержденными приказом Минсельхоза РФ от 27 марта 2006 г. № 90 [4]. Грипп птиц (H5, H7) относится к особо опасным заболеваниям, при которых устанавливают карантин и проводят мероприятия по ликвидации

заболевания, в основу которых заложен механизм разрыва эпизоотической цепи с целью нарушения непрерывности эпизоотического процесса. На эффективность противоэпизоотических мероприятий большое влияние оказывает своевременность постановки окончательного диагноза лабораторными методами. По условиям карантина принимают жесткие меры, направленные в первую очередь на оперативную ликвидацию источника инфекции, а также на устранение факторов передачи вируса. С данной целью проводят вынужденный убой больных и восприимчивых животных в пределах неблагополучного пункта и их уничтожение. При этом принимают все необходимые меры по исключению рассеивания вируса в окружающей среде, что может привести к более тяжелым последствиям. Вводят запрет на перемещение готовой продукции, которая подлежит утилизации. Во время противоэпизоотической работы проводят комплекс санитарных мероприятий специального и общезначимого значения. Для оперативной ликвидации очага особо опасной болезни привлекают бригады МЧС. Зонирование территории заключается в установлении угрожаемой зоны, глубина которой составляет 5 км от границ неблагополучного пункта, и зоны наблюдения с радиусом 10 км от неблагополучного пункта.

Очень остро стоит вопрос уничтожения птиц при ликвидации очага инфекции. На территории Российской Федерации уничтожение и утилизацию трупов птиц проводят в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, утвержденными 4 декабря 1995 г. № 13-7-2/469. Согласно данным правилам определен особый порядок уничтожения трупов павших или вынужденно убитых птиц при ликвидации очагов особо опасных болезней. При высокопатогенном гриппе птиц биологические отходы уничтожают путем сжигания на месте, в трупосжигательных печах или на специально отведенных площадках. Однако правилами регламентирован и иной порядок утилизации в исключительных случаях. Так, при массовой гибели животных от стихийного бедствия и невозможности их транспортировки для утилизации, сжигания или обеззараживания в биотермических ямах допускается захоронение трупов в землю. Если обратиться к определению, то под стихийным бедствием понимают непреодолимую силу природного характера или процесс, приводящий к чрезвычайным ситуациям и значительному ущербу. Масштабные инфекционные заболевания людей и скота (эпидемии/эпизоотии, пандемии/панзоотии) также относят к чрезвычайным ситуациям биологического характера. Недостатками метода сжигания являются невозможность быстрого достижения горения биологических отходов и неполное прогорание тушек птиц до зольного остатка. Кроме того, уничтожение птиц путем сжигания требует много времени и дополнительных затрат (закупка горючего, принудительный поддув воздуха и т. п.).

Анализ международного опыта по уничтожению трупов птиц показал, что захоронение/компостирование является приемлемым, более быстрым и экономичным способом уничтожения биологических отходов, нежели сжигание. Захоронение на месте является лучшей альтернативой транспортировке биологических отходов к местам утилизации [6, 7]. По результатам научных исследований, вирус гриппа при компостирова-



Рис. 10. Организация противоэпизоотических мероприятий: траншеи для сжигания трупов птиц

Fig. 10. Arrangement of anti-epidemic measures: trench for bird carcass burning



Рис. 11. Сжигание трупов птиц в траншее

Fig. 11. Pyre burning of bird carcasses in the trench

нии инактивируется в течение 10–15 суток при условии создания внутренней температуры от 40 до 60 °С и выше. Однако следует учитывать неравномерность распределения температуры в общей массе компостированных биологических отходов, поэтому вскрывать ямы не рекомендуется в течение длительного времени.

В процессе ликвидации очагов инфекции в промышленном птицеводстве на всех пострадавших в 2016–2017 гг. от гриппа H5N8 птицефабриках Российской Федерации, за исключением одной, применяли метод сжигания (рис. 10, 11). Для сжигания всех погибших и вынужденно убитых птиц требовалось от 5 до 10 суток.

Грипп птиц, вызванный подтипами H5 или H7, входит в Перечень болезней, при которых допускается отчуждение животных и изъятие продуктов животноводства [3]. В соответствии с п. 9 Правил отчуждения животных и изъятия продуктов животноводства при ликвидации очагов особо опасных болезней животных граждане и юридические лица имеют право на возмещение ущерба, понесенного ими в результате данных действий [1]. При купировании вспышек болезни разработанные компенсаторные механизмы являются стимулирующими в целях профилактики сокрытия гражданами массового падежа животных.

Во всех случаях карантин с неблагополучных пунктов был снят через 21 день после стемпинг-аута и заключительной дезинфекции. После отмены карантина действовали ограничения не менее 3 месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Жесткие карантинные мероприятия и радикальные меры при ликвидации высокопатогенного гриппа в популяции домашних птиц позволили остановить волну эпизоотии и предотвратили дальнейшее распространение вируса на территории России. В итоге было уничтожено 2 601 532 головы домашних птиц. Быстрая эволюция вируса гриппа птиц и его способность преодолевать межвидовой барьер обуславливают особый интерес к изучению экологии возбудителя и диктуют необходимость проведения жестких противоэпизоотических мероприятий при ликвидации очагов заболевания. Анализ эпизоотической ситуации показывает, что обстановка по гриппу является нестабильной и изменяется с каждым годом, что, в свою очередь, связано с экологической

«пластичностью» вируса гриппа птиц за счет быстрой генетической эволюции. Гетерогенность популяции вируса гриппа типа А в период его эпизоотического распространения и характерная сегментированность генома способствуют процессу быстрой селекции за счет генетического дрейфа и шифта. Ввиду широкого ареала распространения вируса гриппа разных генетических линий нельзя исключать возможности заноса на территорию Российской Федерации новых для нашей страны штаммов, в том числе H5N6. Единственным способом ликвидации вспышек высокопатогенного гриппа птиц на сегодняшний момент остаются радикальные меры, цель которых – разрыв эпизоотической цепи и прекращение эпизоотического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Об отчуждении животных и изъятии продуктов животноводства при ликвидации очагов особо опасных болезней животных: постановление Правительства РФ от 26 мая 2006 г. № 310. – М., 2006.
2. Об утверждении Ветеринарных правил содержания птиц на птицеводческих предприятиях закрытого типа (птицефабриках): приказ Минсельхоза РФ от 3 апреля 2006 г. № 104. – М., 2006. – 5 с.
3. Об утверждении Перечня болезней, при которых допускается отчуждение животных и изъятие продуктов животноводства: приказ Минсельхоза РФ от 22 июня 2006 г. № 184 (ред. от 13.02.2009). – М., 2006.
4. Об утверждении Правил по борьбе с гриппом птиц: приказ Минсельхоза РФ от 27 марта 2006 г. № 90. – М., 2006. – 9 с.
5. Эволюция вируса гриппа А/H5N1 (1996–2016) / М. Ю. Щелканов, И. М. Кириллов, А. М. Шестопалов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – № 6. – С. 245–256.
6. Efficacy of composting dead poultry and farms wastes infected with avian influenza virus H5N1 / Zakia A. M. Ahmed, H. A. Hussin, M. A. Rohaim, Shima Abo El Soud Nasr // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. – 2012. – Vol. 12, No. 5. – P. 588–596.
7. Senne D. A., Panigrahy B. P., Morgan R. L. Effect of composting poultry carcasses on survival of exotic avian viruses: Highly pathogenic avian influenza (HPAI) and adenovirus of egg drop syndrome-76 // Avian Dis. – 1994. – Vol. 38, No. 4. – P. 733–737.
8. World Animal Health Information Database (WAHIS Interface). – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation.

HISTORY OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA ERADICATION IN RUSSIAN FEDERATION IN 2016–2017

M. S. Volkov¹, V. N. Irza², A. V. Varkentin³

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

²Chief Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: irza@arriah.ru

³Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine) FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: varkentin@arriah.ru

SUMMARY

Epidemic patterns of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 spread in the Russian Federation are demonstrated, history of the disease outbreak eradication in domestic poultry is described, basic reasons of the dangerous virus introduction on the commercial farms are analyzed and issues of the outbreak containment are highlighted. Specific properties of H5N8 disease progression and clinical manifestation are demonstrated against H5N1 disease. Data of epidemic investigations of the virus introduction to the closed-type farms are integrated. Basic attention is given to the destruction of poultry died and stamped out during implementation of anti-epidemic measures, and potential alternative ways of biological waste destruction are demonstrated. Principal risks of introduction of emerging influenza virus subtypes into the Russian Federation are determined. Further spread of avian influenza over the Russian territory is expected due to the current epidemic situation, the virus persistence in the vectors, maintenance of its viability in the environment and seasonal migrations of the wild birds. Major threat of the agent introduction comes from the neighbouring East Asia and Far East countries (China, Japan, Korea). Herewith, introduction of potentially zoonotic viruses is also possible. Risk of the virus introduction from the European countries, Near East countries and Central Asia cannot be excluded. For now, drastic measures still remain the only tool for the disease control and the strategy of limited targeted AI vaccination in the backyards minimizes the virus introduction to the commercial farms located in the risk zones.

Key words: highly pathogenic avian influenza, H5N8, outbreak, anti-epidemic measures.

INTRODUCTION

Highly pathogenic type A avian influenza virus (*Influenza A virus*) is persistently circulating in wild bird population in a number of countries, it induces outbreaks of lethal disease in poultry thus causing grave social and economic damage. The "obsolete" term of the disease gives evidence of its danger – classical fowl plaque. The dominating virus reservoir naturally includes aquatic and semi-aquatic birds. It is worth mentioning that over the recent years a tendency to epidemic strain change has been observed: before 2014, H5N1 virus was prevailing and currently the virus with H5N8 antigenic formulae is widely circulating. Such virus subtype has been reported in wild bird and poultry population in European, Asian and African countries. Herewith, all notified cases of this subtype-induced disease reported in wild avifauna are associated with bird mortality that was previously not typical for wild waterfowl. Species composition of birds died of this pathogen is diverse: *Cygnus olor* – mute swan, *Aythya ferina* – common pochard, *Aythya fuligula* – tufted duck, *Podiceps cristatus* – great-crested grebe, *Falco peregrinus* – peregrin falcon, *Netta rufina* – red-crested pochard, *Buteo buteo* – common buzzard, grey heron, *Tachybaptus ruficollis* – little grebe, *Haliaeetus albicilla* – white-tailed

eagle, *Streptopelia decaocto* – Eurasian collared dove, *Anser anser* – gray lag goose, *Accipiter nisus* – sparrowhawk, *Falco vespertinus* – red-footed falcon, *Accipiter gentilis* – goshawk, *Anas penelope* – European wigeon, *Gallinula chloropus* – common moorhen, *Cygnus cygnus* – whooper swan; *Tyto alba* – barn owl, *Branta canadensis* – Canada goose, *Anser albifrons* – white-fronted goose; *Laridae*, *Corvidae*, *Ciconiidae* and *Numididae* birds [8]. In the Russian Federation, highly pathogenic H5N8 virus was originally isolated from dead wild birds during active AI monitoring carried out on Uvs Nuur Lake, Republic of Tyva, in the period of spring migration. Subsequently the virus started its circulation in poultry.

In late 2016 – early 2017, highly pathogenic avian influenza epidemic situation in the Russian Federation deteriorated. AI outbreaks in poultry population were associated with the virus of novel for Russia genotype – 2.3.4. Thus, starting from late 2016, H5N8 influenza outbreaks were reported in the Astrakhan, Rostov, Moscow, Nizhny Novgorod, Samara Oblasts, Krasnodar Krai, Republics of Tatarstan, Mari El, Kalmykia and in Udmurt and Chechen Republics. Outbreaks of quarantine infection caused huge economic losses to commercial poultry farms in Astra-

khan, Rostov, Moscow Oblasts and Republic of Tatarstan. The virus infected chickens, guinea fowl, geese, ducks, and turkeys.

Wild bird migration is one of the key factors that definitely affect the development of AI epidemic situation; and occurrence of new disease outbreaks cannot be excluded due to infeasibility of wild avifauna control.

MATERIALS AND METHODS

Standard methods of epidemic investigations were used. The investigation data were systemized and subjected to epidemic analysis. Autopsy, sampling and transportation of pathological samples were performed according to SP 1.3.3118-13 "Safe handling of pathogenicity (hazard) group I-II microorganisms"; SP 1.2.036-95 "Procedure for record, storage, transfer and transportation of pathogenicity group I-IV microorganisms"; Veterinary rules of avian influenza A laboratory diagnosis approved by the RF MoA Order of April 3, 2006 No. 105.

Initial diagnosis was made in the laboratories of the RF Subjects; their diagnoses were confirmed by the FGBI "ARRIAH". Photo- and video recording devices were used during the visits to the poultry farms.

RESULTS AND DISCUSSION

Spread of highly pathogenic avian influenza H5N8. In late 2016 – early 2017, wide spread of highly pathogenic influenza H5N8 virus was reported in poultry and wild birds. The influenza virus was introduced onto large commercial poultry farms in the Astrakhan, Moscow, Rostov Oblasts and Republic of Tatarstan. As part of the anti-epidemic measures 2,592,019 commercial poultry were destroyed that amounted to 0.57% of total bird population housed on poultry farms in Russia. In addition, since late 2016 influenza of this subtype has been reported on backyard farms and small poultry farms in Krasnodar Krai, Republics of Kalmykia, Tatarstan and Mari El, in Udmurt and Chechen Republics, and in Moscow, Samara and Nizhniy Novgorod Oblasts. The number of destroyed poultry amounted to 9,513 birds – 0.009% of poultry population housed on the farms of the above-mentioned types. Total amount of birds destroyed as a result of anti-epidemic measures reached 2,601,532 birds.

Influenza H5N8 clinical and post-mortem signs. Anamnesic data collected during epidemic investigations of highly pathogenic influenza H5N8 cases reported in poultry population including cases of the virus introduction on the closed-type commercial farms demonstrated that no influenza-typical pathognomonic signs could be identified on the early stage due to hyperacute disease cause. While clinical disease of birds infected with A/H5N1 virus-associated influenza included cyanosis of the comb, jowls, claws that became of purple color (Fig. 1, P. 4), influenza caused by H5N8 virus developed more rapidly: birds suddenly refused from water and feed, developed coma-like state and died in several hours (Fig. 2, P. 4). The infection period can be hard to determine in this case due to the short incubation period of the disease. Post-mortem examination of birds died of influenza H5N8 often demonstrated the following post-mortem lesions: petechiae in abdominal fat and serous membranes (Fig. 3–5, P. 5); acute pancreatitis (edematic, loose and unevenly colored pancreas; easy to rupture parenchyma and blood-filled vessels), (Fig. 6, 7, P. 5); splenomegaly (enlarged spleen with uneven dotted pattern, flabby structure and excessive necrotic

debris) (Fig. 8, P. 5); duodenitis and enteritis (unevenly hyperemic and edematic mucous membranes of small intestine; mucous exudate in the lumen; blood-filled vessels of the serous membrane); hepatosis (enlarged, soft textured liver of uneven maddy color; the liver was easy to rupture and demonstrated necrotic debris at the site of the cut); petechia and expressed blood-filling in reproductive organs (Fig. 9, P. 6). In some cases internal bleeding was reported.

Causes of the influenza virus introduction on the closed-type poultry farms. The basic cause of the virus introduction onto the closed-type farms is associated with the shortcomings in the biosecurity of the farm. As experience shows, the basic reasons of the biosecurity system failure include violation of the veterinary and sanitary rules by the personnel, lack of heat treatment of feed, access of synanthropic and wild birds to the poultry feed on the farm and contamination of compound feed with their feces, absence of vehicle disinfection, lack of knowledge on biosecurity among the personnel, absence of operational washing and changing facilities, negligence of intercycle prophylaxis intervals, etc. Natural influenza virus reservoir is known to be wild waterfowl, who migrate over the long distance and maintain the virus circulation and its existence as a biological species [5]. Synanthropic birds can be a peculiar virus vector from the wild birds to the poultry population. Fecal-oral route of the infection transmission facilitate the intensive virus spread as high concentrated pathogen is excreted with the feces of the infected birds. Use of wild bird feces contaminated feed and litter is the prevailing factor of the virus introduction onto the farm. Thus, sunflower seed hulls contaminated with the feces of wild and synanthropic birds used as a litter were one of the most probable causes of the initial virus introduction onto one of the poultry farms in the south of Russia. Backyard poultry owned by people working on the farm can also be a factor of the virus introduction to the farm.

In order to minimize the risk of pathogen introduction to the RF farms there are effective Veterinary rules of poultry keeping on the closed-type poultry farms (poultry establishments) approved by the RF MoA Order of April 3, 2006 No. 104. These rules are mandatory for business operators involved in poultry raising and breeding [2].

Anti-epidemic measures for HPAI outbreak containment in the Russian Federation are taken in compliance with the Rules of avian influenza control approved by the RF MoA Order of March 27, 2006 No. 90 [4]. Avian influenza (H5, H7) is one of the highly dangerous diseases that require quarantine and disease control measures, which are based on a mechanism aimed at epidemic chain disruption thus providing for interruption of the epidemic process persistence. Efficacy of the anti-epidemic measures is highly influenced by timely laboratory confirmation of the diagnosis. Quarantine imposition implies strict measures to be taken, first of all, for rapid eradication of the source of the infection as well as for the elimination of the virus transmission factors. To this effect, all the diseased and susceptible birds in the infected settlement are stamped out and destructed. Herewith, all necessary measures are taken to exclude the virus spread in the environment that can potentially lead to more drastic consequences. Movement of final products is banned and such products are subject to destruction. During anti-epidemic measure implementation, a complex of special and general sanitary measures is taken. EMERCOM teams are engaged for rapid containment of highly dangerous disease outbreaks. Zon-

ing includes establishment of infected zone (5 km radius from the border of the infected settlement) and surveillance zone (10 km radius from the infected settlement).

Of particular importance is the issue of bird destruction during the outbreak containment. In the Russian Federation destruction and disposal of bird carcasses is performed according to the Veterinary and sanitary rules of collection, disposal and destruction of biological wastes approved on December 4, 1995 No. 13-7-2/469. These rules prescribe specific procedure for the destruction of the carcasses of birds died or stamped out during the containment of a highly dangerous disease outbreak. In case of highly pathogenic avian influenza the biological wastes are destructed by on-site pyre burning, in the incinerators or in the specifically designated areas. However, the rules also specify other procedure for destruction, which can be used in exceptional cases. Thus, animal carcasses may be buried in case of mass mortality of animals due to emergency and infeasibility of their carcass transportation for disposal, incineration or composting. If referred to the definition, the emergency is an Act of God or a process resulting in emergency and significant damage. Major diseases of humans and livestock (epidemics/ epizootics, pandemics/ panzootics) are also qualified as biological emergencies. The pain points of pyre burning include impossibility of rapid inflammation of the biological wastes and incomplete carcass combustion to ash. Pyre burning additionally requires much time and extra expenses (purchase of combustibles, forced air feeding, etc.).

Analysis of the international experience in poultry carcass destruction demonstrated that burial/composting is a more eligible, rapid and efficient way of biowaste destruction as compared to pyre burning. On-site burial is the best alternative to the biowaste transportation to the disposal sites [6, 7]. Research results demonstrate that during composting the influenza virus is inactivated within 10–15 days under core temperature 40–60°C and above. However, nonconformity of temperature in bulk of composted biological wastes should be regarded, thus the composing pits shall not be opened for a long periods.

Pyre burning method was used on all influenza H5N8 infected commercial farms (excluding one farm) during the containment of the outbreaks in 2016–2017 (Fig. 10, 11, P. 7). Five to ten days are required for burning of all dead and stamped out birds.

Influenza H5 or H7 is included in the List of diseases, which envisage seizure of animals and animal product confiscation [3]. According to paragraph 9 of the Rules of animal seizure and animal product confiscation for containment of highly dangerous animal diseases, all citizens and legal entities have a right for compensation for losses suffered due to such actions [1]. During the disease outbreak containment, the available compensation tool serves as a stimulus for the citizens not to conceal mass mortality of poultry.

In all cases, the quarantine of the infected settlements was lifted in 21 days after the stamping out and final dis-

infection. Restrictions were in effect for at least 3 months after the quarantine lifting.

CONCLUSION

Strict quarantine and other measures taken for highly pathogenic avian influenza eradication in the poultry population allowed to stop the epidemic and to prevent further spread of the virus in the Russian territory. In total, 2 601 532 poultry birds were destroyed. Rapid evolution of the avian influenza virus and its ability to cross species barrier drive specific attention to the agent ecology and necessitate tough anti-epidemic measures to be taken for the disease outbreak containment. Epidemic situation analysis demonstrates that the situation on avian influenza is unstable and it is changing annually that is, in its turn, preconditioned by the ecological flexibility of the AI virus due to its rapid genetic evolution. Heterogeneity of Type A influenza virus population during its epidemic spread and typical segmented genome facilitate rapid selection process due to genetic drift and genetic shift. As different genetic lineages of the influenza virus are spread over the wide area, introduction of exotic strains including H5N6 strains into the Russian Federation cannot be excluded. For now, drastic measures remain the only tool for eradication of highly pathogenic avian influenza outbreaks and they shall be aimed at epidemic chain disruption and epidemic process termination.

REFERENCES

1. Seizure of animals and confiscation of animal products during containment of outbreaks of highly dangerous animal diseases: RF Governmental Decree of May 26, 2006 No. 310. – M., 2006.
2. On approval of Veterinary rules for poultry housing in the closed-type poultry farms (poultry establishments): RF MoA Order of April 3, 2006 No. 104. – M., 2006. – 5 p.
3. On approval of List of diseases, which envisage seizure of animals and animal product confiscation: RF MoA Order of June 22, 2006 No. 184 (as amended on 13.02.2009). – M., 2006.
4. Approval of Rules of avian influenza control: RF MoA Order of March 27, 2006 No. 90. – M., 2006. – 9 p.
5. Influenza A/H5N1 virus evolution (1996–2016) / M. Yu. Schelkanov, I. M. Kirillov, A. M. Shestopalov [et al.] // *Voprosy Virusologii*. – 2016. – No. 6. – P. 245–256.
6. Efficacy of composting dead poultry and farm wastes infected with avian influenza virus H5N1 / Zakia A. M. Ahmed, H. A. Hussin, M. A. Rohaim, Shima Abo El Soud Nasr // *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* – 2012. – Vol. 12, No. 5. – P. 588–596.
7. Senne D. A., Panigrahy B. P., Morgan R. L. Effect of composting poultry carcasses on survival of exotic avian viruses: Highly pathogenic avian influenza (HPAI) and adenovirus of egg drop syndrome-76 // *Avian Dis.* – 1994. – Vol. 38, No. 4. – P. 733–737.
8. World Animal Health Information Database (WAHIS Interface). – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Dis-easeinformation.

КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ЧЕРЕЗ ИНКУБАЦИОННОЕ ЯЙЦО

А. С. Оганесян¹, А. В. Варкентин², Н. Е. Баскакова³, А. К. Караулов⁴

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

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

³ Ведущий юрист-консульт, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: baskakova@arriah.ru

⁴ Руководитель ИАЦ, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: karaulov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлен анализ литературы, посвященной проблеме распространения вируса гриппа птиц с инкубационным яйцом, и качественная оценка риска ввоза в Российскую Федерацию инкубационного яйца в условиях действия ветеринарно-санитарных мер по гриппу при импорте. Отмечена вероятность передачи низкопатогенных вирусов гриппа птиц через инкубационное яйцо птиц сельскохозяйственного назначения, сопряженная с вероятностью контаминации этими агентами поверхности яйца и тары. Высокая вероятность распространения вируса гриппа птиц с товарным яйцом отмечена у перепелов, индеек, гусей, кур. Доказательства истинной вертикальной передачи высокопатогенного гриппа птиц ограничены, при этом признается, что инфекция проявляется в виде системного поражения органов (бурса, тимус, селезенка, сердце, поджелудочная железа, почки, головной мозг, трахея, легкие, надпочечники и скелетные мышцы). Отмечается, что сохранность вируса может быть более продолжительна на перьях, в мясе птицы, а также что благоприятными условиями для сохранения жизнеспособности вируса во внешней среде являются повышенная влажность, нейтральное значение pH и низкая температура. Меры по ограничению перемещения инкубационного яйца рассматриваются как наиболее адекватные для предотвращения распространения заболевания между хозяйствами. Подчеркивается, что отсутствие рисков возникновения на своей территории гриппа птиц в орнитофауне не может гарантировать ни одна из стран. Меры по гриппу птиц, рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения животных, при импорте инкубационного яйца признаны адекватными для предотвращения международного распространения болезни вне зависимости от патогенности вируса.

Ключевые слова: эпизоотология, анализ риска при импорте, грипп птиц.

ВВЕДЕНИЕ

Товарооборот инкубационного яйца в мире является одним из наиболее значимых для отрасли птицеводства факторов для поддержания стад и темпов производства. По оценке Института конъюнктуры аграрного рынка (ИКАР), объемы импорта инкубационного яйца с 2010 по 2015 г. увеличились более чем в два раза: с 300–330 млн до 700 млн в год. Внутреннее производство тоже динамично развивалось, ежегодно прибавляя по 200–300 млн, и к 2015 г. достигло количества около 2,9 млрд, хотя эксперты признают, что точной статистики по этому сектору не ведется [1]. Однако, помимо очевидных выгод, оборот инкубационного яйца сопряжен с рисками трансграничного распространения инфекционных болезней птиц, в том числе гриппа

птиц, ньюкаслской болезни, болезни Гамборо, болезни Марека, ринотрахеита индеек, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита птиц, гепатита уток, тифа, пуллороза, пастереллеза, микоплазмозов и пситтакоза [10].

Помимо распространения вируса гриппа птиц в дикой авифауне [24], последние несколько лет значительное влияние на ограничение международной торговли продукцией птицеводства оказывает распространение вируса среди домашних птиц [22, 28].

С учетом высокой значимости оборота инкубационного яйца для Российской Федерации, в том числе ввоза из-за рубежа, и напряженности мировой эпизоотической ситуации по гриппу птиц целесообразно рассмотреть вопрос о риске распространения вируса гриппа через инкубационное яйцо.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали официальные данные Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) об эпизоотической ситуации по гриппу птиц на территории стран мира [30].

Анализ документов, научных публикаций и опубликованных результатов оценки риска проводили традиционным методом анализа документов с элементами контент-анализа в виде совокупности логических построений, направленных на раскрытие основного содержания. Оценку сопряженного риска по гриппу птиц при торговле инкубационным яйцом осуществляли с использованием метода качественной оценки риска [14] с модификациями по N. Murray [20], принимая во внимание товарно обоснованный подход, рекомендуемый МЭБ [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация опасности. Патоген. По данным МЭБ, грипп птиц определяется как инфекция домашних птиц, вызываемая вирусом гриппа типа А.

С учетом патогенности вируса заболевание разделяют на два типа: высокопатогенный и низкопатогенный грипп птиц (ВГП и НГП) [27].

Азиатская линия ВГП подтипа H5N1 может инфицировать многие виды домашних и диких птиц и даже млекопитающих. Реассортанты данного подтипа, кото-

рые содержат сегменты генов вирусов H5N1 (например, вирусы H5N2, H5N5 и H5N8), выявляли среди домашних птиц и у млекопитающих [7].

Вирус гриппа птиц подтипа H9N2 (НГП) получил широкое распространение среди домашних птиц в странах Ближнего Востока и Азии и был выявлен у людей [15]. Также данный подтип вируса обнаруживали у свиней и собак [31].

Вирусы ВГП H5N1 имеют короткий период сохранения в окружающей среде по сравнению с низкопатогенными вирусами подтипа H5 [25]. Вирусы НГП, выделяемые от диких водоплавающих птиц, остаются инфекционными при температуре 17 °С в течение 207 сут, а при 28 °С – 102 сут. На сохранение вируса в воде влияет ряд условий: температура, рН и соленость. Вирусы наиболее стабильны при рН 7,4–8,2, низкой температуре (8–17 °С) и низкой солёности воды (0–20 000 ppm) [6, 21].

Полевые наблюдения некоторых исследователей позволяют предполагать, что вирусы НГП могут выживать в фекалиях в течение 105 сут в неуказанных условиях, а в контролируемых лабораторных условиях вирусы гриппа птиц оставались жизнеспособными от 1 до 7 сут при температуре 15–35 °С. При более низких температурах (4 °С) выживаемость вируса в фекалиях варьировала от менее 4 до 30–40 сут в разных экспериментах. При защите от солнечного света стойкость вируса на разных поверхностях или в почве варьировала от 2 сут до более чем 2 нед (и, возможно, нескольких месяцев) при температурах от 4 до 15–30 °С. Сохранность вируса может быть более продолжительной на перьях. В мясе птицы (рН 7) вирус выживает в течение 6 мес при 4 °С. Отбор проб в окружающей среде в Камбодже показал, что вирусы гриппа не могут долго сохраняться в условиях тропического климата: хотя РНК вирусов ВГП азиатских линий H5N1 обнаруживали во многих образцах (например, в почве, соломе), выделение вируса было успешным только из одного стоячего водоема [7].

Российскими исследователями также отмечалось, что благоприятными условиями для сохранения жизнеспособности вируса во внешней среде являются повышенная влажность, нейтральная среда и низкая температура [3].

По состоянию на январь – май 2017 г. в мире зарегистрированы следующие подтипы высокопатогенного гриппа птиц типа А: H5, H5N1, H5N2, H5N5, H5N6, H5N9, H7N1, H7N3, H7N9, а вирус H5N8 превалировал по числу вспышек в мире. Вспышки ВГП среди домашних и диких птиц регистрировали в следующих странах: Австрия, Алжир, Бангладеш, Бельгия, Болгария, Босния и Герцеговина, Великобритания, Венгрия, Вьетнам, Германия, Гонконг, Греция, Дания, Египет (эндемичен с 2008 г.), Израиль, Индия, Иран, Ирландия, Испания, Италия, Казахстан, Камбоджа, Камерун, Китай, Кот-д'Ивуар, Кувейт, Ливия, Литва, Македония, Малайзия, Мексика, Мьянма, Непал, Нигер, Нигерия, Нидерланды, Польша, Португалия, Россия, Румыния, Сербия, Словакия, Словения, Соединенные Штаты Америки, Тайвань, Тунис, Уганда, Украина, Финляндия, Франция, Хорватия, Чехия, Швейцария, Швеция, Южная Корея, Япония [29].

Неблагополучие по НГП в 2017 г. (с января по май) официально регистрировалось в Германии (H5N1, H5N2, H5N3), Камбодже (H7N3), Ливии (H7), Нидерландах (H7N9), Соединенных Штатах Америки (H5N2 – дикие птицы, H7N9), Тайване (H5N2), Франции (H5N1,

H5N2, H5N3, H5N9), Чили (H7N6), Южно-Африканской Республике (H5N2, H7N9) [29].

Вероятность риска передачи вируса с товаром. Для распространения инфекционных болезней птиц с инкубационным яйцом этиологический агент должен быть способен заражать целевые виды домашней птицы и либо распространяться в репродуктивном тракте и сохраняться на поверхности яйца, либо проникать через яичную скорлупу и заражать содержимое до или после того, как яйцо было снесено.

Инфекция домашней птицы, вызываемая вирусами НГП, может приводить к снижению яйценоскости, хотя чаще регистрируют симптомы поражения респираторного тракта. Болезнь проявляется атаксией и иногда диареей, птица угнетена, оперение взъерошено. Панкреатический некроз описан у индюков [8].

Стоит признать, что сообщений об инфицировании птичьих яиц вирусами НГП не было, хотя в отдельных работах сообщалось о сальпингите, сопровождающемся легким или умеренным снижением яйценоскости при инфицировании вирусом H7N2 [9].

Несмотря на то что в отношении ВГП признается, что инфекция проявляется в виде системного поражения органов (бурса, тимус, селезенка, сердце, поджелудочная железа, почки, головной мозг, трахея, легкие, надпочечники и скелетные мышцы), доказательства истинной вертикальной передачи высокопатогенного гриппа птиц ограничены [16, 25]. Вирус ВГП H5N2 был выделен из желтка и белка яиц, полученных от естественно зараженных [17] и экспериментально инфицированных кур [19]. Согласно неопубликованным исследованиям, цитируемым D. E. Swayne и J. R. Beck [26], демонстрировалось наличие вируса ВГП в 85–100% яиц, заложенных через 3–4 дня после экспериментального заражения домашней птицы. Однако вирус ВГП является летальным для эмбрионов, и инкубация инфицированных яиц в эксперименте никогда не была продемонстрирована. Эпизоотологическое исследование распространения ВГП в Нидерландах в 2003 г. показало, что механическая передача через контаминированное яйцо и яичные лотки могла быть важным фактором распространения болезни [23].

В проанализированной российской научной литературе по данному вопросу имеется единичный случай упоминания о трансовариальной передаче вируса гриппа птиц, а именно о выделении из клоакального мазка птенца серебристой чайки, не имевшего контакта с внешней средой, вируса А/серебристая чайка/ Астрахань 458/85 H13N6 [5].

В процессе анализа зарубежной и российской научной литературы не нашли информации о конкретных случаях заноса на птицеводческие предприятия вирусов НГП при ввозе/перемещении инкубационного яйца, но исходя из имеющихся данных можно заключить, что вероятность передачи вирусов НГП через инкубационное яйцо птиц сельскохозяйственного назначения, по-видимому, первично ограничивается вероятностью контаминации этими агентами поверхности яйца, тары, в то время как при ограниченности доказательств вертикальной передачи ВГП вирус выделялся из желтка и с поверхности яйца. При этом признается системное поражение органов при ВГП и высокая вероятность распространения вирусов ВГП с товарным яйцом у перепелов, индеек, гусей, кур, что подтверждено в опубликованных исследованиях [12, 17, 18].

Меры снижения риска. С учетом ограниченности данных, связывающих естественное инфицирование гриппом с передачей вируса через инкубационное яйцо, рекомендации Кодекса здоровья наземных животных МЭБ (далее – Кодекс) по безопасной торговле инкубационным яйцом, вне зависимости от патогенности вируса (ст. 10.4.10), безусловно, адекватны для предотвращения международного распространения гриппа птиц при экспортно-импортных операциях.

Анализируя меры стран Европейского союза в отношении борьбы с гриппом птиц [11], можно отметить, что среди прочего они содержат запреты на перемещение яйца вне зависимости от патогенности гриппа птиц. При этом яйцо, а также птица, корма, мясо, люди и предметы, содержащие патоген, рассматриваются в качестве потенциальных источников заноса вирусов гриппа в хозяйство или распространения между хозяйствами.

Однако племенные предприятия, которые производят инкубационное яйцо и суточных цыплят для экспорта, проводят исследования в соответствии со ст. 10.4.32 Кодекса [27]. При этом отметим, что, согласно указанной статье, дополнительные требования к надзору для подтверждения статуса хозяйства, благополучного по гриппу птиц, включают доказательства отсутствия инфицирования вирусами ВГП и НГП. Птица, содержащаяся в таких хозяйствах, должна быть подвергнута исследованиям на предмет выявления или выделения вируса, основанным на принципе рандомизированных проб, с обращением к серологическим

методам и соблюдением общих требований Кодекса. Анализы должны проводиться с регулярностью, зависящей от риска распространения инфекции, но как минимум каждые 21 сут.

Хотя повсеместно признается диагностическая ценность массовых серологических обследований, не следует недооценивать значимость надзора, построенного на клинических осмотрах поголовья. В главе 10.4 Кодекса отмечается, что целью клинического надзора является выявление клинических признаков гриппа птиц, в первую очередь ВГП, на уровне стада.

Отслеживание же производственных показателей, таких как повышение падежа, снижение потребления кормов или воды, выявление респираторных признаков, снижение яйценоскости, – это основной фактор раннего обнаружения как ВГП, так и НГП.

Снижение потребления кормов и яйценоскости иногда является единственным индикатором выявления вируса НГП. Клинический надзор и лабораторные исследования должны дополнять друг друга и проводиться последовательно для прояснения ситуации.

Результаты серологического обследования (рандомизированного или вероятностного) позволяют уверенно доказывать отсутствие инфекции, вызванной вирусами гриппа птиц, в стране, зоне или компартменте. В связи с этим особое значение приобретает тщательное документирование проводимых исследований [27].

Исходя из данных, представленных на рисунке, говорить о несопряженности распространения вирусов гриппа птиц с оборотом инкубационного яйца не мо-

Рис. Результаты качественной оценки риска по гриппу птиц, сопряженного с ввозом инкубационного яйца в РФ



жем, а отсутствие на своей территории гриппа птиц ни одной страной пока не доказано, поэтому сопряженный риск не может быть незначительным (импорт сопряжен с риском), а доказательства благополучия источника товара применимы по отношению к отдельным производствам (компартаментам). Действующие меры стандартной карантинной политики РФ, эквивалентной рекомендациям МЭБ [2, 4], можно рассматривать как эффективные в отношении вирусов гриппа птиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вероятность передачи низкопатогенных вирусов гриппа птиц через инкубационное яйцо, по-видимому, первично ограничивается вероятностью контаминации поверхности яйца и тары, в то время как при недостаточности доказательств вертикальной передачи высокопатогенного гриппа вирус выделялся из желтка. С учетом ограниченности данных, связывающих естественную инфекцию с вертикальной передачей через инкубационное яйцо, рекомендации Кодекса здоровья наземных животных МЭБ на сегодня наиболее приемлемы для предотвращения международного распространения гриппа птиц при торговле вне зависимости от патогенности вируса.

Риск, сопряженный с распространением гриппа птиц (вне зависимости от патогенности) при торговле инкубационным яйцом, в условиях применения мер, рекомендованных МЭБ, оценен как «более чем незначительный». Действие стандартной карантинной политики Российской Федерации учитывает рекомендации МЭБ и, следовательно, эффективно предотвращает занос вируса гриппа птиц с инкубационным яйцом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В России растет производство инкубационного яйца // Агроинвестор. – URL: <http://www.agroinvestor.ru/companies/article/22826-v-rossii-rastet-proizvodstvo-inkubatsionnogo-yaytsa/>.
2. Единые ветеринарные (ветеринарно-санитарные) требования, предъявляемые к товарам, подлежащим ветеринарному контролю (надзору): утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 18 июня 2010 г. № 317.
3. Лагуткин Н. А., Хафизов Е. Д. Сохраняемость вируса гриппа А при химических и физических факторах воздействия, по данным ВНИИВиМ и ВНИИВСГЭ // Вет. консультант. – 2006. – № 12. – С. 9.
4. Нормативные документы // Россельхознадзор. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/class/3/23>.
5. Циркуляция вируса гриппа А серотипа H13 среди чайковых птиц Северного Каспия (1979–1985 гг.) / С. С. Ямникова, Т. О. Ковтун, Г. А. Дмитриев [и др.] // Вопр. вирусологии. – 1989. – Т. 34 (4). – С. 426–430.
6. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature / J. D. Brown, G. Goekjian, R. Poulson [et al.] // Vet. Microbiol. – 2009. – Vol. 136, No. 1–2. – P. 20–26.
7. Avian Influenza. – URL: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HPAI.pdf.
8. Capua I, Terregino C. Clinical and pathology of avian influenza infections, guidelines for farm visit and differential diagnosis // Avian Influenza and Newcastle Disease, a Field and Laboratory Manual. – Milan, 2009. – P. 45–71.
9. Characteristics of H7N2 (nonpathogenic) avian influenza virus infections in commercial layers, in Pennsylvania, 1997–98 / A. F. Ziegler [et al.] // Avian Dis. – 1999. – Vol. 43, No. 1. – P. 142–149.
10. Cobb S. P. The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2011. – Vol. 30, No. 1. – P. 165–175.
11. Council directive 2005/94/EC of 20 December 2005 on Community measures for the control of avian influenza and repealing Directive 92/40/EEC // Off. J. European Union, 14.01.2006.
12. Detection of Hong Kong 97-like H5N1 influenza viruses from eggs of Vietnamese waterfowl / Y. Li [et al.] // Arch. Virol. – 2006. – Vol. 151, No. 8. – P. 1615–1624.
13. Facilitating safe trade // OIE. – URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/overview/facilitating-safe-trade/>.
14. Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products. Introduction and Qualitative Risk Analysis. Vol. 1 / N. Murray, S. MacDiarmid, M. Wooldridge [et al.]. – Paris: OIE, 2004. – 59 p.
15. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 / K. M. Butt [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, No. 11. – P. 5760–5767.
16. Influenza / B. C. Easterday, V. S. Hinshaw, D. A. Halvorson // Diseases of Poultry / ed. B. W. Calnek. – 10th ed. – Ames, Iowa, 1997. – P. 583–605.
17. Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak / D. T. Cappucci, Jr. [et al.] // Avian Dis. – 1985. – Vol. 29, No. 4. – P. 1195–1200.
18. Isolation of avian influenza virus A subtype H5N1 from internal contents (albumen and allantoic fluid) of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs and oviduct during a natural outbreak / N. Promkuntod [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1081. – P. 171–173.
19. Laboratory studies with the Pennsylvania avian influenza viruses (H5N2) / C. W. Beard, M. Brugh, D. C. Johnson // In Proc. 88th Annual Conference of the United States Animal Health Association, 21–26 October 1984. – Fort Worth, Texas. United States Animal Health Association, Richmond, Virginia. – P. 462–473.
20. Murray N. Import Risk Analysis. Animals and Animal Products. – Wellington: New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, 2002. – 183 p.
21. Persistence of avian influenza viruses in water / D. E. Stallknecht, S. M. Shane, M. T. Kearney, P. J. Zwank // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, No. 2. – P. 406–411.
22. Questions and answers on avian influenza. – URL: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAI/EN_QA%20Jan2017.pdf.
23. Risk factors for the introduction of high pathogenicity avian influenza virus into poultry farms during the epidemic in the Netherlands in 2003 / M. E. Thomas [et al.] // Prev. Vet. Med. – 2005. – Vol. 69, No. 1–2. – P. 1–11.
24. Situation Report and Guidance for H5N8 and other Eurasian H5 clade 2.3.4.4 Avian Influenza Viruses. – URL: www.oie.int/fileadmin/home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAI/H5N8_OFFLU_Statement-1.pdf.
25. Swayne D. E., Halvorson D. A. Influenza // Diseases of Poultry. – 11th ed. – Ames, Iowa, 2003. – P. 135–160.
26. Swayne D. E., Beck J. R. Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in egg products // Avian Pathol. – 2004. – Vol. 33, No. 5. – P. 512–518.
27. Terrestrial Animal Health Code. – 2016. – Chap. 10.4. – URL: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&httmfile=chaptre_avian_influenza_viruses.htm (дата обращения: 08.05.17).
28. Update on avian influenza in animals (types H5 and H7) // OIE. – URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2016/>.
29. WAHIS // OIE. – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary.
30. WAHIS // OIE. – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.
31. Weighing serological evidence of human exposure to animal influenza viruses – a literature review / R. S. Sikkema [et al.] // Euro Surveill. – 2016. – Vol. 21, No. 44. – URL: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.44.30388>.

QUALITATIVE RISK ASSESSMENT OF AVIAN INFLUENZA VIRUS TRANSMISSION THROUGH INCUBATION EGGS

A. S. Oganessian¹, A. V. Varkentin², N. Ye. Baskakova³, A. K. Karaulov⁴

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

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

³ Leading Legal Advisor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: baskakova@arriah.ru

⁴ Head of the Information Analysis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: karaulov@arriah.ru

SUMMARY

Analysis of literature on avian influenza (AI) virus transmission through incubation eggs and qualitative assessment of risk of incubation egg import to the Russian Federation in the context of veterinary and sanitary measures against avian influenza currently in place for imported products are presented. Probability of low-pathogenic AI virus transmission through poultry incubation eggs due to possible contamination of the egg and package surfaces with the said agents is indicated. Probability of AI virus transmission through commercial eggs derived from quails, turkeys, geese, chickens is shown to be high. Evidence of actual vertical transmission of highly pathogenic avian influenza virus is limited, however, it is recognized that the infection manifests by systemic lesions in the organs (bursa, thymus, spleen, heart, pancreas, kidneys, brain, trachea, lungs, adrenals and skeletal muscles). It is noted that the virus can persist on bird feathers and in bird meat for a long period. In addition, high humidity, neutral pH level and low temperature are shown to be favourable conditions for the virus survival in the ambient environment. Incubation egg movement restrictive measures are considered the most adequate for prevention of the disease spread between holdings. It is underlined that no country can guarantee the absence of the risk of avian influenza occurrence in avifauna. Anti-AI measures for incubation egg importation recommended by the World Organization for Animal Health are considered adequate for prevention of international disease spread regardless of the virus pathogenicity.

Key words: epidemiology, analysis of import-associated risk, avian influenza

INTRODUCTION

Turnover of incubation eggs is one of the most significant factors for flock maintenance and production rates in the world poultry industry. According to the Institute for Agricultural Market Studies' assessment incubation egg imports had increased more than twice between 2010 and 2015, from 300–330 mln up to 700 mln per year. Domestic production also was on rise increasing by 200–300 mln annually and reached to 2.9 bln in 2015. While experts recognize that there are no precise statistical data for this sector [1]. However, besides evident benefits turnover of incubation eggs is associated with risks of transboundary spread of avian infectious diseases including avian influenza, Newcastle disease, infectious bursal disease, Marek's disease, turkey rhinotracheitis, duck hepatitis, fowl typhoid, pullorum disease, fowl cholera, mycoplasmosis and ornithosis [10].

Avian influenza virus (AI) spread in poultry [22, 28] in addition to its spread in wild birds [24] has had a significant impact on limitation of international trade in poultry products over the last few years.

Taking into account that turnover of incubation eggs is of high importance for the Russian Federation, as well as significance of their import and complicated epidemic situation on avian influenza in the world it would be worth considering the risk of AI virus transmission through incubation eggs.

MATERIALS AND METHODS

Official data of the World Organization for Animal Health (OIE) on avian influenza epidemic situation in various countries in the world were used [30].

Documents, scientific publications and published data on risk assessment were analyzed by traditional analysis methods using content analysis elements as complex logical constructions aimed at showing the substantial content. Assessment of the risk associated with trade in incubation eggs was performed using qualitative risk assessment method [14] modified by N. Murray [20] taking into account commodity-based approach recommended by the OIE [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Hazard identification. Pathogen. According to the OIE, avian influenza is an infection of poultry caused by type A avian influenza virus.

The disease is classified into two types depending on the virus pathogenicity: highly pathogenic and low pathogenic avian influenza (HPAI and LPAI) [27].

Asian lineage of H5N1 HPAI is able to infect many poultry and wild bird species and even mammals. Reassortant viruses of such type containing H5N1 virus genome segments (for example, H5N2, H5N5 and H5N8 viruses) were detected in poultry and in mammals [7].

H9N2 AI virus (LPAI) widely spread in poultry in the Near East and Asian countries and was detected in humans [15]. The virus of such subtype was also detected in pigs and in dogs [31].

H5N1 HPAI viruses persist in the environment for a short period as compared to H5 low pathogenic avian influenza viruses [25]. LPAI viruses isolated from wild waterfowl remains infectious for 207 days at 17 °C and for 102 days at 28 °C. Some factors influence the virus persistence in water: temperature, pH level and salinity. The viruses demonstrate the highest stability at pH 7.4–8.2, low temperature (8–17 °C) and low water salinity (0–20,000 ppm) [6, 21].

Field observations carried out by some researchers suppose that LPAI viruses can survive in feces for 105 days under unspecified conditions; AI viruses remained viable for 1–7 days at 15–35 °C under controlled conditions. At lower temperatures (4 °C) the virus survivability in feces varied from less than 4 up to 30–40 days in different experiments. The virus persistence on different surfaces and in soil protected from sunlight varied from 2 days up to more than 2 weeks (and possibly for several months) at 4 °C up to 15–30 °C. The virus can persist on feathers for longer time. In bird meat (pH 7.0) the virus persists for 6 months at 4 °C. Environmental sampling in Cambodia showed that AI viruses could not persist for a long time under tropical climate conditions. Despite of frequent H5N1 Asian lineage HPAIV RNA detection in many samples (for example, in soil and straw) the virus was successfully isolated only once, in one stagnant water body [7].

Russian researchers also noted that high humidity, neutral environment and low temperatures could promote the virus survival in environment [3].

As of January – May 2017, the following type A HPAI virus subtypes were registered in the world: H5, H5N1, H5N2, H5N5, H5N6, H5N9, H7N1, H7N3, H7N9 but H5N8 virus prevailed based on the number of outbreaks. HPAI outbreaks in wild birds and poultry were reported in the following countries: Austria, Algeria, Bangladesh, Belgium, Bulgaria, Bosnia and Herzegovina, Great Britain, Hungary, Vietnam, Germany, Hong Kong, Greece, Denmark, Egypt (endemic since 2008), Israel, India, Iran, Ireland, Spain, Italy, Kazakhstan, Cambodia, Cameroon, China, Cote d'Ivoire, Kuwait, Libya, Lithuania, Macedonia, Malaysia, Mexico, Myanmar, Nepal, Niger, Nigeria, Netherlands, Poland, Portugal, Russia, Romania, Serbia, Slovakia, Slovenia, United States of America, Taiwan, Tunisia, Uganda, Ukraine, Finland, France, Croatia, Czech Republic, Sweden, Switzerland, South Korea, Japan [29].

The following countries were officially registered as LPAI-infected in 2017 (January – May): Germany (H5N1, H5N2, H5N3), Cambodia (H7N3), Libya (H7), Netherlands (H7N9), United States of America (H5N2 – wild birds, H7N9),

Taiwan (H5N2), France (H5N1, H5N2, H5N3, H5N9), Chile (H7N6), Republic of South Africa (H5N2, H7N9) [29].

Probability of risk for the virus transmission through commodity. For transmission of avian infectious diseases through incubation eggs their etiological agents should be able to infect targeted poultry species or spread in reproductive tract and persist on egg surface or penetrate through egg shell and infect the egg content prior or after egg laying.

LPAI-caused infection in poultry can result in egg production drop but more often symptoms of respiratory tract infection are registered. The disease manifestations are as follows: ataxia and rarely diarrhea, depression, ruffled feathers. Pancreatic necrosis was reported in turkeys [8].

It should be recognized that there were no reports on infection of bird eggs with LPAI viruses while H7N2 virus infection-associated salpingitis and slight to moderate egg production drop were reported in some studies [9].

Although it is recognized that HPAI infection manifests by systemic lesions in organs (bursa, thymus, spleen, heart, pancreas, kidneys, brain, trachea, lungs, adrenals, skeletal muscles) the evidence of actual vertical transmission of HPAI is limited [16, 25]. H5N2 HPAI virus was isolated from yolk and white of eggs derived from naturally infected [17] and experimentally infected [19] chickens. According to non-published studies cited by D. E. Swayne and J. R. Beck [26], it was demonstrated that HPAI virus was present in 85–100% of eggs placed for incubation 3–4 days after experimental infection of poultry. However, HPAI virus is lethal for embryos and no incubation of infected eggs has been demonstrated in experiments. Epidemic investigation of HPAI spread in Netherlands in 2003 showed that mechanical transmission through contaminated eggs and egg trays could be significant factor for the disease spread [23].

Only one case of transovarian AIV transmission namely A/silver gull/Astrakhan 458/85 H13N6 virus isolation in cloacal swab from silver gull youngling that had no contact with outside environment was described in reviewed relevant Russian scientific literature [5].

No information on specific cases of LPAI introduction to poultry establishments through introduced/moved incubation eggs was found during the review of foreign and Russian scientific literature. However, based on available data it can be concluded that probability of LPAI virus transmission through poultry incubation eggs appears to be primarily limited to possible contamination of egg surface, package with the said agents while despite of limited evidence of HPAI vertical transmission the HPAI virus was isolated from the egg yolk and surface. Therewith, it is recognized that HPAI causes systemic lesions in organs and probability of HPAI virus transmission through marketable eggs of quails, turkeys, geese and fowl is high and these are confirmed by published studies [12, 17, 18].

Risk mitigation measures. Taking into account limited data on association of natural AI infection with the virus transmission through incubation eggs the OIE Terrestrial Animal Health Code (hereinafter, the Code) recommendations on safe trade in incubation eggs regardless of the virus pathogenicity (Art. 10.4.10) are undoubtedly adequate for international avian influenza spread prevention during export/import.

It may be noted based on analyzed EU measures for avian influenza control [11] that they, inter alia, include bans on egg movements regardless of avian influenza patho-

Hazard Identification

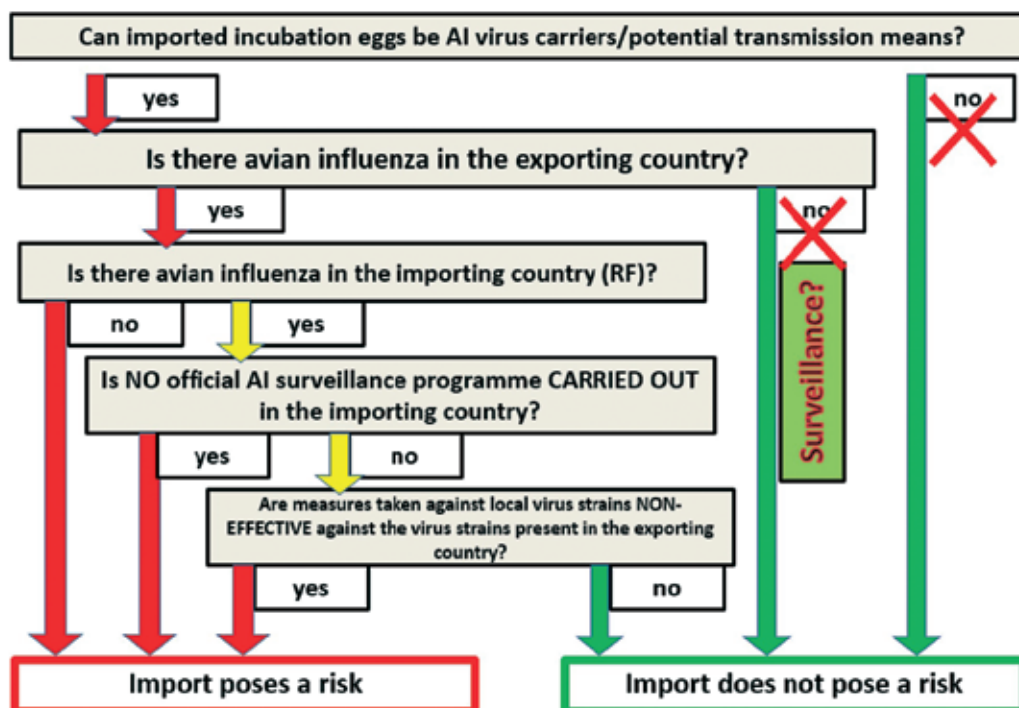


Fig. Results of qualitative assessment of AI risk associated with incubation egg importation to the Russian Federation

genicity. Therewith, eggs as well as poultry, feeds, meat, humans and fomites are considered potential sources of AI introduction to an establishment and AI spread between establishments.

However, breeding establishments that produce incubation eggs and day-old chicks for export carry out tests in accordance with Art. 10.4.32 of the Code [27]. Therewith, it should be noted that according to the said Article additional requirements for surveillance for recognition of AI freedom of the establishment include evidence of HPAI and LPAI infection absence. Poultry kept at such establishments should be tested for the virus detection or isolation based on randomized sampling and using serological methods in accordance with the Code general requirements. The tests should be carried out at intervals that depend on risk of the infection spread but at least every 21 days.

Although diagnostic significance of serological surveys is commonly recognized, the importance of animal clinical examination-based surveillance should not be underestimated. Article 10.4 of the Code states that the main goal of clinical surveillance is detection of AI clinical signs, first of all HPAI signs at flock level.

Monitoring of production indicators such as mortality increase, decrease in feed or water intake, detection of respiratory signs, drop in egg production is a major factor for early detection of both HPAI and LPAI.

Decrease in feed intake and in egg production sometimes is the only indicator of LPAI virus presence. Clinical surveillance and laboratory tests should complement each other and be carried out consecutively to clarify the situation.

Results of serological survey (randomized or stochastic) allow the absence of the infection caused by AI viruses in a country, zone or compartment to be strongly proved. This underlines the importance of thorough documenting of performed tests [27].

Based on data presented in the Figure incubation egg turnover-associated AI virus spread cannot be excluded. Besides, no country has proved yet AI absence in its territory that is why, the associated risk cannot be insignificant (import poses a risk) and evidence of the disease freedom of the commodity source is applicable to individual production establishments (compartments). Standard quarantine measures currently in place in the Russian Federation that are equivalent to the OIE recommendations [2, 4] can be considered effective against avian influenza viruses.

CONCLUSION

Probability of LPAI virus transmission through poultry incubation eggs appears to be primarily limited to possible contamination of egg surface and package while despite of limited evidence of HPAI vertical transmission the HPAI virus was isolated from egg yolk. Taking into account limited data on association of natural AI infection with the virus transmission through incubation eggs the OIE Terrestrial Animal Health Code recommendations are currently the most appropriate for international avian influenza spread prevention during trade regardless the virus pathogenicity.

Risk associated with avian influenza spread (regardless the virus pathogenicity) during trade in incubation eggs providing that the OIE recommended measures were implemented was assessed as "more than insignificant".

Standard quarantine policy of the Russian Federation currently in place in the Russian Federation complies with the OIE recommendations and, consequently, effectively prevents AI introduction with incubation eggs.

REFERENCES

1. Incubation egg production is on rise in Russia // *Agroinvestor*. – URL: <http://www.agroinvestor.ru/companies/article/22826-v-rossii-rastet-proizvodstvo-inkubatsionnogo-yaytsa/>.
2. Common veterinary (veterinary and sanitary) requirements for commodities subject to veterinary control (surveillance) approved by the TU Commission Decision No. 317 of 18 June 2010.
3. Lagutkin N. A., Khafizov Ye. D., Influence of physical and chemical factors on type A avian influenza virus survivability based on VNIIViM and VNIIVSGE data // *Vet. consultant*. – 2006. – No. 12. – P. 9.
4. Regulations // *Rosselkhoz nadzor*. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/class/3/23>.
5. Circulation of type A H13 serotype avian influenza in larid birds in the Northern part of Caspian Sea (1979–1985) / S. S. Yamnikova, T. O. Kovtun, G. A. Dmitriyev [et al.], // *Voprosy virusologii*. – 1989. – Vol. 34 (4). – P. 426–430.
6. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature / J. D. Brown, G. Goekjian, R. Poulson [et al.] // *Vet. Microbiol*. – 2009. – Vol. 136, No. 1–2. – P. 20–26.
7. Avian Influenza. – URL: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HPAI.pdf.
8. Capua I., Terregino C. Clinical and pathology of avian influenza infections, guidelines for farm visit and differential diagnosis // *Avian Influenza and Newcastle Disease, a Field and Laboratory Manual*. – Milan, 2009. – P. 45–71.
9. Characteristics of H7N2 (nonpathogenic) avian influenza virus infections in commercial layers, in Pennsylvania, 1997–98 / A. F. Ziegler [et al.] // *Avian Dis*. – 1999. – Vol. 43, No. 1. – P. 142–149.
10. Cobb S. P. The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments // *Rev. Sci. Tech. OIE*. – 2011. – Vol. 30, No. 1. – P. 165–175.
11. Council directive 2005/94/EC of 20 December 2005 on Community measures for the control of avian influenza and repealing Directive 92/40/EEC // *Off. J. European Union*, 14.01.2006.
12. Detection of Hong Kong 97-like H5N1 influenza viruses from eggs of Vietnamese waterfowl / Y. Li [et al.] // *Arch. Virol*. – 2006. – Vol. 151, No. 8. – P. 1615–1624.
13. Facilitating safe trade // OIE. – URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/overview/facilitating-safe-trade/>.
14. Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products. Introduction and Qualitative Risk Analysis. Vol. 1 / N. Murray, S. MacDiarmid, M. Wooldridge [et al.]. – Paris: OIE, 2004. – 59 p.
15. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 / K. M. Butt [et al.] // *J. Clin. Microbiol*. – 2005. – Vol. 43, No. 11 – P. 5760–5767.
16. Influenza / B. C. Easterday, V. S. Hinshaw, D. A. Halvorson // *Diseases of Poultry* / ed. B. W. Calnek. – 10th ed. – Ames, Iowa, 1997. – P. 583–605.
17. Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak / D. T. Cappucci, Jr. [et al.] // *Avian Dis*. – 1985. – Vol. 29, No. 4. – P. 1195–1200.
18. Isolation of avian influenza virus A subtype H5N1 from internal contents (albumen and allantoic fluid) of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs and oviduct during a natural outbreak / N. Promkuntod [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. – 2006. – Vol. 1081. – P. 171–173.
19. Laboratory studies with the Pennsylvania avian influenza viruses (H5N2) / C. W. Beard, M. Brugh, D. C. Johnson // *In Proc. 88th Annual Conference of the United States Animal Health Association*, 21–26 October 1984. – Fort Worth, Texas. United States Animal Health Association, Richmond, Virginia. – P. 462–473.
20. Murray N. Import Risk Analysis. Animals and Animal Products. – Wellington: New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, 2002. – 183 p.
21. Persistence of avian influenza viruses in water / D. E. Stallknecht, S. M. Shane, M. T. Kearney, P. J. Zwank // *Avian Dis*. – 1990. – Vol. 34, No. 2. – P. 406–411.
22. Questions and answers on avian influenza. – URL: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAI/EN_QA%20Jan2017.pdf.
23. Risk factors for the introduction of high pathogenicity avian influenza virus into poultry farms during the epidemic in the Netherlands in 2003 / M. E. Thomas [et al.] // *Prev. Vet. Med*. – 2005. – Vol. 69, No. 1–2. – P. 1–11.
24. Situation Report and Guidance for H5N8 and other Eurasian H5 clade 2.3.4.4 Avian Influenza Viruses. – URL: www.oie.int/fileadmin/home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAI/H5N8_OFFLU_Statement-1.pdf.
25. Swayne D. E., Halvorson D. A. Influenza // *Diseases of Poultry*. – 11th ed. – Ames, Iowa, 2003. – P. 135–160.
26. Swayne D. E., Beck J. R. Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in egg products // *Avian Pathol*. – 2004. – Vol. 33, No. 5. – P. 512–518.
27. Terrestrial Animal Health Code. – 2016. – Chap. 10.4. – URL: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_avian_influenza_viruses.htm (дата обращения: 08.05.17).
28. Update on avian influenza in animals (types H5 and H7) // OIE. – URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2016/>.
29. WAHIS // OIE. – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary.
30. WAHIS // OIE. – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.
31. Weighing serological evidence of human exposure to animal influenza viruses – a literature review / R. S. Sikkema [et al.] // *Euro Surveill*. – 2016. – Vol. 21, No. 44. – URL: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.44.30388>.

СРАВНЕНИЕ РЕАКТОГЕННОГО И ИММУНОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

С. А. Похвальный¹, М. С. Кукушкина², В. Ю. Кулаков³, Н. В. Мороз⁴, Н. А. Перевозчикова⁵

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

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

³ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kulakov@arriah.ru

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

⁵ Профессор, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», e-mail: perevozchikova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Изучали гуморальный ответ и двигательную активность реснитчатого эпителия слизистой оболочки трахеи у птиц, привитых против инфекционного ларинготрахеита, с помощью цилиостатического теста. Вакцины, вне зависимости от способа применения, снижали двигательную активность слизистой оболочки трахеи птиц на 5–9% с 3-х по 7-е сут после прививки. При этом окулярное применение вакцин у незначительного количества цыплят вызывало развитие односторонних серозных конъюнктивитов с благоприятным исходом. Оральная вакцинация не вызывала каких-либо клинических изменений у птиц. При серологическом мониторинге был выявлен более ранний и напряженный иммунный ответ у птиц, привитых окулярным способом. Требуемый уровень серопротекции в опытных группах превысил минимальное значение (80%) начиная с 16-х сут после вакцинации. При оральном применении срок формирования иммунного ответа зависел от величины иммунизирующей дозы вакцинного препарата. При этом вакцина отечественного производства по безвредности и иммуногенному действию не уступала импортным аналогам.

Ключевые слова: инфекционный ларинготрахеит птиц, реактогенность, цилиостатический тест, сероконверсия.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) является высококонтагиозный вирус вида *Gallid herpesvirus 1*. ИЛТ – острая респираторная болезнь кур, наносящая значимый экономический ущерб промышленному птицеводству во всем мире [4, 10]. Как правило, с целью борьбы и профилактики ИЛТ используют живые вакцины. При этом вакцинные штаммы обладают способностью к горизонтальной передаче и реверсии при пассировании *in vivo* [4, 6, 8, 11].

Возбудители таких респираторных болезней птиц, как инфекционный бронхит кур, ньюкаслская болезнь, метапневмовирусная инфекция, респираторный микоплазмоз, а также ИЛТ, вызывают остановку скоординированных биений ресничек слизистой оболочки трахеи. В результате накапливается воспалительный экссудат, что приводит к закупорке просвета гортани и трахеи и гибели птицы от удушья. Повышению летальности способствует насаивание секундарной микрофлоры или нахождение птицы в неблагоприятных зоогигиенических условиях (например, наличие сквозняка, высокой запыленности или загазованности воздуха в птичниках) [2, 3, 5, 7, 9], поэтому показатель

летальности не может являться объективной оценкой высокой вирулентности полевого вируса.

В связи с этим цилиостатический тест, заключающийся в балльном оценивании степени остановки мерцательной активности слизистой оболочки трахеи птиц, является более корректной оценкой по сравнению с показателем летальности птицы в инфицированной группе. Данный метод особенно ценен при сравнительной оценке остаточной реактогенности аттенуированных производственных штаммов вируса ИЛТ и исследовании безвредности вакцинных препаратов, поскольку используемые штаммы *a priori* не вызывают гибели птицы [2].

В результате многократных опытов по контрольному заражению цыплят патогенным штаммом «Богатцевский» вируса ИЛТ было установлено наличие связи между напряженностью гуморального иммунитета и протективным действием вакцины. Был обоснован уровень сывороточных антител, гарантирующий защищенность вакцинированных птиц, значение которого двукратно (или более) превосходит минимальное значение позитивно-негативного порога в используемом

Таблица
Основные характеристики трех живых вакцин против ИЛТ

| Характеристика | Эмбрион-вакцина из штамма «О» | Нобилис ИЛТ | Галливак LT |
|---|---|---|-----------------------|
| Штамм | «О» | «Serva» | «Т-20» |
| Предприятие-изготовитель | ВНИИЗЖ, Россия | Intervet International B.V., Нидерланды | Merial, Франция |
| Вирусный материал | Гомогенат ткани ХАО и ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур | Гомогенат ткани ХАО и ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур | ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур |
| Способ применения | Окулярно и орально | Окулярно | Окулярно и орально |
| Доза вируса в одной прививной дозе вакцины, ЭИД ₅₀ | 500 (окулярно) 2000 (орально) | 320 | 500 |

СПФ – категория животных, в организме которых отсутствуют определенные патогенные микроорганизмы и антитела к ним;

ХАО – хорионлантоисная оболочка эмбрионов кур;

ЭИД₅₀ – 50% эмбриональная инфицирующая доза;

ЭЭЖ – экстраэмбриональная жидкость эмбрионов кур.

диагностическом наборе иммуноферментного анализа (ИФА) [1].

Целью настоящих исследований явилось сравнение реактогенного и иммуногенного действия трех живых вакцин против ИЛТ, зарегистрированных на территории РФ, посредством цилиостатического теста, клинического наблюдения и серологического мониторинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Живые вакцины против ИЛТ. В работе были использованы коммерчески доступные вакцинные препараты, основные характеристики которых представлены в таблице.

Подопытная птица. В опыте использовали 180 цыплят 35-суточного возраста кросса «Хайсекс браун». Эксперимент проводили на базе вивария ФГБУ «ВНИИЗЖ» в боксовом помещении. Птиц соответственно сформированным группам содержали в отдельных перчаточных изоляторах с контролем температуры и давления профильтрованного воздуха и автономной подачей воды и корма.

Цилиостатический тест. Получение трахеальных эксплантатов и оценка их цилиарной активности были проведены согласно методам, описанным ранее [2, 3], с некоторыми изменениями. Кратко: трахеальные поперечные срезы (кольца) из верхнего, среднего и нижнего участков трахеи толщиной 0,5–1,0 мм в количестве 3, 4 и 3 штук соответственно от каждой птицы были исследованы под световым микроскопом инвертированного типа с 60–150-кратным увеличением. Величину показателя остановки двигательной активности каждого трахеального эксплантата оценивали по пятибалльной шкале от 0 до 4. При этом 0 баллов означало отсутствие биения ресничек протяженностью не более 5% периметра окружности эксплантата, 1 балл – не более 25%, 2 балла – не более 50%, 3 балла – не более 75%, 4 балла – отсутствие движения ресничек до 100% периметра окружности. Затем рассчитывали сумму баллов (ΣC) цилиостаза эпителия слизистой оболочки 10 трахеальных колец, отобранных от каждого цыпленка. Полученную

величину суммы в баллах (от 0 до 40) переводили в проценты по формуле

$$C, \% = 2,5 \times \Sigma c.$$

Исследование сывороток крови. В сыворотках крови цыплят определяли титры антител к вирусу ИЛТ с помощью твердофазного метода ИФА, используя наборы ProFLOCK LT ELISA Kit (Zoetis, США), значения титров указаны в размерности десятичных логарифмов (lg). Величина позитивно-негативного порога для данной тест-системы составляет 340 (2,531 lg).

Схема опыта. Были сформированы 6 групп цыплят по 30 голов. Группы 1 и 2 были привиты окулярно и орально эмбрион-вакциной против ИЛТ из штамма «О», группы 3 и 4 – окулярно и орально вакциной производства Merial, группа 5 – окулярно вакциной производства Intervet International B.V. согласно инструкциям по применению. Цыплята группы 6 служили в качестве контроля. За птицами на протяжении 28 сут после вакцинации вели ежедневное клиническое наблюдение.

Для проведения цилиостатического теста из каждой группы отбирали по два цыпленка в случайном порядке на 1–7, 9 и 12-е сут после вакцинации. Также для исследования сыворотки в ИФА на наличие антител к вирусу ИЛТ были получены образцы крови до и после вакцинации на 7, 16, 19, 24 и 28-е сут. В каждой группе цыплят определяли выраженную в процентах долю птиц с положительными пробами сывороток с защитной концентрацией антител (уровень серопротекции).

Статистическая обработка результатов. Использовали стандартные методы статистической обработки выборок варьирующих переменных. В тексте представлены средние значения титров сывороточных антител и их стандартные отклонения ($x \pm s$), установленные по результатам не менее 10 выборочных измерений ($n = 10$). Вычислительные операции и построение диаграмм выполняли с помощью приложения Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клиническое наблюдение за птицей после окулярной и оральной прививки. У незначительного числа цыплят (10–15%) подопытных групп, привитых окулярно тремя вакцинами, на 5–7-е сут наблюдали развитие окулярной реакции в виде одностороннего серозного конъюнктивита (рис. 1). При этом признаки поствакцинальной реакции полностью исчезли к 8–9-м сут после прививки.

У цыплят, привитых орально вакцинами ВНИИЗЖ и Merial, отсутствовала поствакцинальная реакция. На протяжении всего периода наблюдения каких-либо других клинических признаков отмечено не было.

Оценка влияния вакцинации на цилиарную активность трахеи. После прививки у цыплят наблюдали в динамике двигательную активность ресничек слизистой оболочки трахеи (C, %).

Приведенные на диаграмме результаты (рис. 2) иллюстрируют, что изученные вакцины мало различались между собой по времени наступления, силе и продолжительности цилиостатического воздействия независимо от способа введения. Наибольшее цилиостатическое воздействие наблюдали на 3–7-е сут (5–9% цилиостаза). Во всех опытных группах цилиарная активность полностью восстанавливалась к 9–12-м сут после прививки.



Рис. 1. Характерная окулярная реакция на 6-е сут после окулярной прививки (справа) по сравнению с непораженным глазом (слева)

Fig. 1. Typically occurring eye reaction on Day 6 post ocular vaccination (right) compared to a healthy eye (left)

Серологический мониторинг иммунного статуса вакцинированной птицы. Оценивали гуморальный ответ до и на 7, 16, 19, 24, 28-е сут после вакцинации. По первичным данным по каждой группе был вычислен уровень серопротекции (доля иммунных птиц в группе, у которых образовались специфические антитела в ответ на иммунизацию в защитной концентрации).

Результаты исследований (рис. 3) позволяют считать, что изученные вакцинные препараты обладают достаточно высокой иммуногенностью, так как обеспечивают уровень серопротекции выше 80%. Так, в подопытных группах, привитых вакциной ВНИИЗЖ окулярно и орально, количество птиц с защитным титром антител уже на 16-е сут достигло 82 и 92% соответственно. Вакцина Intervet, примененная окулярно, обеспечила 100% защиты на 19-е сут исследования. Напряженный гуморальный иммунный ответ на окулярную прививку вакцины против ИЛТ производства Merial достиг 89% на 16-е сут. При этом защитный уровень антител у цыплят после оральной прививки вакцины Merial сформировался на неделю позже.

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях интенсивного выращивания и высокой плотности содержания птиц циркулирующие полевые вирусы ослабляют резистентность поголовья и открывают ворота для вторичной условно-патогенной микрофлоры бактериальной природы.

Патогенное действие вируса ИЛТ выражается в репродукции в реснитчатом эпителии слизистой оболочки трахеи, в результате чего пораженные клетки перестают выполнять функцию очистки вдыхаемого воздуха от посторонних частиц. В норме благодаря скоординированному биению ресничек эпителия трахеи частицы в составе слизи перемещаются в сторону гортани и глотки и проглатываются со слюной в пищевод. На данном этапе инфекционный процесс имеет благоприятный исход, если не усугубляется высокой запыленностью или загазованностью воздуха и наслоением бактериальной микрофлоры [3, 5, 7, 9].

В последние 20 лет в США, Австралии и других странах ИЛТ считается эмерджентной проблемой для бройлеров, поскольку до этого вспышки умеренных форм ИЛТ наблюдали исключительно у птицепоголовья яичного направления. Необходимость специфической профилактики ИЛТ в бройлерных хозяйствах отсутствовала [4, 8, 10]. При этом необходимо учесть,

что оральный способ вакцинации бройлеров наиболее удобен по сравнению с окулярным.

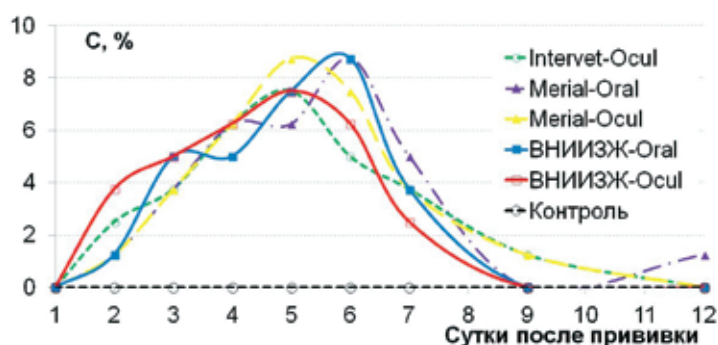
Ранее была показана роль одичавшего вакцинного вируса ИЛТ эмбрионального происхождения в ряде произошедших вспышек болезни у бройлеров. Клиническое проявление ИЛТ характеризовалось развитием конъюнктивита, дыхательной недостаточностью, повышенной смертностью и снижением яйценоскости [4, 8, 10]. Проведенное сравнение культуральной и эмбриональной вакцин против ИЛТ выявило такой недостаток эмбрионального штамма, как способность к реверсии на 20-м пассаже *in vivo* [6]. Однако строгое соблюдение ветеринарно-санитарного режима на птицефабрике и правильное проведение вакцинации предотвращают передачу вакцинного вируса от привитого поголовья к восприимчивому.

При клиническом наблюдении было установлено в качестве поствакцинальной реакции наличие одностороннего серозного конъюнктивита у 10–15% цыплят только в тех группах, которые были привиты окулярно.

По результатам цилиостатического теста была выявлена остановка биений ресничек эпителия площадью 5–9%, что является достаточно умеренным влиянием вакцинных штаммов вне зависимости от способа применения вакцин. При этом полевые изоляты различной степени вирулентности, как правило, вызывают цилиостаз на всей поверхности слизистой оболочки трахеи [2, 3, 5, 7, 9].

При анализе результатов серологического мониторинга была установлена достаточно высокая иммуногенность изученных вакцин. Используемый уровень серопротекции, в отличие от сероконверсии,

Рис. 2. Оценка в динамике цилиостаза, вызванного вакцинами разных производителей в зависимости от способа введения



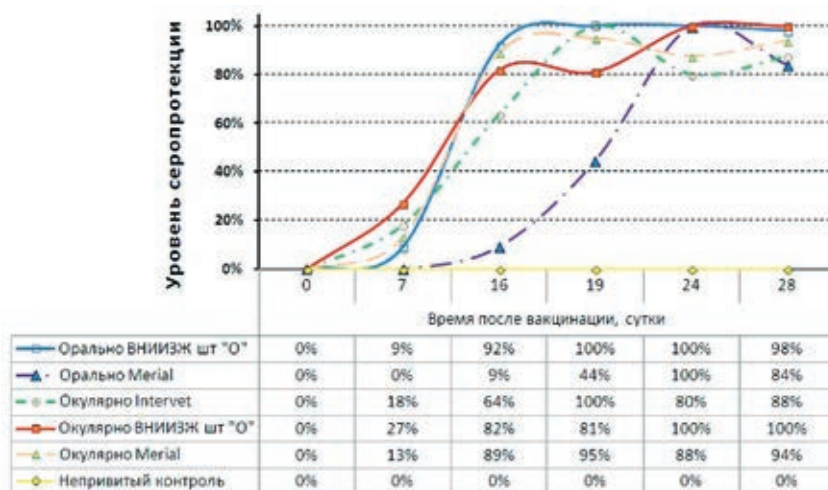


Рис. 3. Серологический мониторинг после оральной и окулярной прививки разными вакцинами

предъявляет более жесткие требования к вакцинам, поскольку выражает долю птиц в привитой группе, у которых после прививки образовались специфические антитела к вакцинному антигену в защитной концентрации. Для эмбрион-вакцины против ИЛТ из штамма «О» (ВНИИЗЖ) в качестве защитной концентрации антител принято двукратное превышение величины позитивно-негативного порога набора твердофазного метода ИФА, которое составляет значение 680 (2,832 Ig) [1].

Таким образом, уровень серопротекции в опытных группах превысил минимальное значение (80%) с 16-х сут после вакцинации. Однако в группе птиц, привитых вакциной Merial орально, была отмечена задержка иммунного ответа на неделю. Связано это, скорее всего, с тем, что и для окулярного, и для орального применения прививная доза вакцины составляет одинаковую величину – 500 ЭИД₅₀.

Непосредственным местом репродукции вируса являются респираторный тракт и конъюнктивы [11, 12], а при проглатывании вакцины с питьевой водой значительная часть вируса попадает в пищевод и не вызывает формирования иммунитета. Лишь незначительная часть вакцинного вируса, осевшая на верхнее небо ротовой полости, оказывает после репродукции иммуногенное действие. Таким образом, следует предположить, что задержка иммунного ответа при оральном применении вакцины Merial вызвана низкой прививной дозой вируса.

Для сравнения, одна прививная окулярная доза вакцины ВНИИЗЖ содержит не менее 500 ЭИД₅₀ штамма «О», а пероральная доза в 4 раза выше окулярной и составляет не менее 2000 ЭИД₅₀, что обеспечивает быстрое наступление напряженного иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что зарегистрированные на территории РФ живые вакцины являются безвредными и иммуногенными. При этом препарат отечественного производства по динамике развития и напряженности гуморального ответа не уступает импортным аналогам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исследование возможности использования результатов серологических реакций для опосредованной оценки

напряженности иммунитета против инфекционного ларинготрахеита птиц / А. В. Бочарников, В. Ю. Кулаков, Т. В. Оковитая, Ю. В. Зуев // Ветеринарна медицина-2004: міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2004. – Вип. 84. – С. 125–128.

2. Похвальный С. А., Кулаков В. Ю. Влияние вируса инфекционного ларинготрахеита птиц на цилиарную активность слизистой оболочки трахеи кур // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: материалы IV Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2016. – С. 45–50.

3. Bagust T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus // Avian Pathol. – 1986. – Vol. 15, No. 3. – P. 581–595.

4. Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program // Avian Dis. – 2008. – Vol. 52, No. 1. – P. 1–7.

5. Guy J. S., Barnes H. J., Morgan L. M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: Comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, No. 1. – P. 106–113.

6. Guy J. S., Barnes H. J., Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage // Avian Dis. – 1991. – Vol. 35, No. 2. – P. 348–355.

7. Infection of broilers with two virulent strains of infectious laryngotracheitis virus: Criteria for evaluation of experimental infections / A. Vagnozzi, S. M. Riblet, S. M. Williams [et al.] // Avian Dis. – 2015. – Vol. 59, No. 3. – P. 394–399.

8. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: A review / K. R. Menendez, M. García, S. Spatz, N. L. Tablante // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 2. – P. 108–117.

9. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus / S. Hayashi, Y. Odagiri, T. Kotani, [et al.] // Avian Dis. – 1985. – Vol. 29, No. 4. – P. 943–950.

10. Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis / N. C. Kirkpatrick, A. Mahmoudian, C. A. Colson [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35, No. 6. – P. 449–453.

11. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILT) vaccines / A. Rodríguez-Avila, I. Oldoni, S. Riblet, M. García // Avian Dis. – 2007. – Vol. 51, No. 4. – P. 905–911.

12. Replication characteristics of infectious laryngotracheitis virus in the respiratory and conjunctival mucosa / V. R. A. P. Reddy, L. Steukers, Y. Li [et al.] // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 5. – P. 450–457.

COMPARISON OF REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF LIVE VACCINES AGAINST INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

S. A. Pokhvalny¹, M. S. Kukushkina², V. Yu. Kulakov³, N. V. Moroz⁴, N. A. Perevozchikova⁵

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

² Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kukushkina@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kulakov@arriah.ru

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

⁵ Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: perevozchikova@arriah.ru

SUMMARY

Humoral immune response and ciliary activity of tracheal mucosa of poultry, vaccinated against infectious laryngotracheitis using ciliostatic test, was studied. Regardless of the vaccination route the vaccines decreased the ciliary activity by 5–9 % on Days 3 to 7 post vaccination. Herewith the vaccine ocular application in some chicks induced one-eye serous conjunctivitis, which resolved subsequently. Oral vaccination did not cause any clinical changes. Serological monitoring revealed an earlier and stronger immunity in poultry vaccinated by ocular route. The required seroprotection level in test groups was higher than the minimal value (80%) starting from Day 16 post vaccination. The period of immunity development after oral vaccination correlated with the vaccine dose volume. Moreover the domestic vaccine was highly competitive with foreign vaccines in immunogenicity and reactogenicity.

Key words: infectious laryngotracheitis, reactogenicity, ciliostatic test, seroconversion.

INTRODUCTION

Infectious laryngotracheitis (ILT) is caused by a highly contagious virus of *Gallid herpesvirus 1* type. ILT is a severe respiratory disease of chickens causing significant economic losses in industrial poultry production all over the world [4, 10]. As a rule, live vaccines are used to control and prevent ILT. Herewith the vaccine strains are able to transmit horizontally and reverse when passaged *in vivo* [4, 6, 8, 11].

The agents of such avian respiratory diseases as infectious bronchitis, Newcastle disease, metapneumovirus infection, respiratory mycoplasmosis and ILT affect regular beatings of cilia on tracheal mucosa. As a result an inflammatory exudate accumulates and blocks the lumen of a larynx and trachea, leading to death from choking. Secondary microflora or management of poultry under unfavourable animal health conditions (like draughts, heavy dust burden or gas contamination of the air in poultry houses) contribute to a higher lethality [2, 3, 5, 7, 9]. That's why the lethality rate cannot be judged as an objective criterion of a field virus high virulence.

In this context the ciliostatic test, involving scoring of ciliary beat frequency on avian tracheal mucosa, is a more adequate evaluation, compared to lethality rate in the infected group. This technique is especially valuable when comparing residual reactogenicity of attenuated ILTV production strains and testing safety of vaccines, because the used strains do not kill poultry *a priori* [2].

Multiple challenge tests when chicks were challenged with ILTV Bogatitshevsky pathogenic strain demonstrated that there is a correlation between humoral immunity strength and vaccine protectivity. The level of sera antibodies ensuring protection of vaccinated poultry was justified; its value was twice bigger (or more) than the minimal value of positive/negative threshold used in the ELISA test-kit [1].

This study was aimed at the comparison of reactogenicity and immunogenicity of three live vaccines against ILT, authorized in the RF using the ciliostatic test, clinical observations and serological monitoring.

MATERIALS AND METHODS

Live vaccine against ILT. Commercially available vaccines were used in this study; their basic characteristics are shown in the table below.

Test poultry. 180 35 day-old chicks of Hisex Brown cross were used for the study. The trial was performed in the aseptic room of the FGBI "ARRIAH" animal facilities. Birds were divided into groups and placed into glove boxes with temperature and filtered air pressure controllers and autonomous feed and water supply.

Ciliostatic test. Preparation of tracheal explants and assessment of their ciliary activity were performed according to the methods described before [2, 3], but slightly amended. Briefly: 3, 4 and 3 0.5–1.0 mm tracheal cross sections (rings) from upper, middle and lower parts from every bird were examined under inverted microscope using 60–150× magnification. Immobility value for each tracheal explant was scored using five point system from 0 to 4 point meant absence of ciliary beating in the area of not more than 5% of the section perimeter; 1 point – not more than 25%; 2 points – not more than 50%; 3 points not more than 75% and 4 points meant absence of ciliary movements up to 100% of the section perimeter. Then the sum of points given for epithelial ciliostasis of 10 tracheal rings from each chick was calculated (Σc). The calculated sum of points (from 0 to 40) was transformed into percentage using the following formula:

$$C, \% = 2,5 \times \Sigma c.$$

Sera testing. ILTV antibody titers were determined in chicken sera in solid-phase ELISA using ProfLOCK LT ELISA Kits ("Zoetis", USA), titers were expressed as logs (lg). The value of positive/negative threshold for the above-mentioned test kit is 340 (2.531 lg).

Table
Basic characteristics of three live vaccines against ILT

| Criterion | Embryo vaccine based on O strain | Nobilis ILT | Gallivac LT |
|---|---|---|----------------------------|
| Strain | O | Serva | T-20 |
| Manufacturer | ARRIAH, Russia | Intervet International B.V., Netherlands | Merial, France |
| Viral material | Tissue homogenate, CAM and EEF of SPF chicken embryos | Tissue homogenate, CAM and EEF of SPF chicken embryos | EEF of SPF chicken embryos |
| Application route | Ocular and oral | Ocular | Ocular and oral |
| Virus dose in one vaccine inoculation dose, EID ₅₀ | 500 (ocular) 2000 (oral) | 320 | 500 |

SPF – category of animals free from specific pathogenic factors and antibodies against them;
CAM – chorioallantoic membrane of chicken embryos;
EID₅₀ – 50% embryo infecting dose; EEF – extra embryonic fluid of chicken embryos.

Study design. 6 groups of chicks (30 birds per group) were formed. Groups 1 and 2 were vaccinated ocularly and orally using embryo vaccine against ILT based on strain O, Groups 3 and 4 were immunized ocularly and orally with Merial vaccine, Group 5 was vaccinated ocularly with Intervet International B.V. vaccine according manufacturer's instructions. Birds were clinically observed every day for 28 days post vaccination.

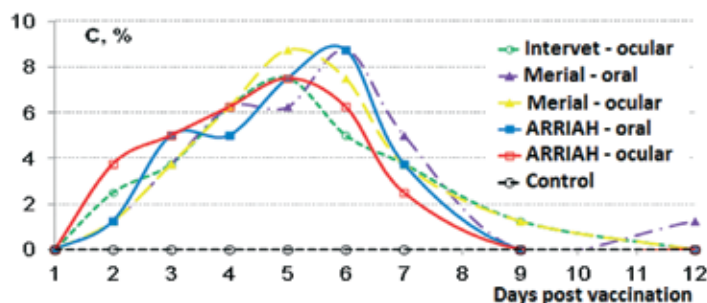
To perform a ciliostatic test two chicks were randomly taken from each group on Days 1–7, 9 and 12 post vaccination. To test sera in ELISA for ILTV antibodies, blood samples were taken before vaccination and on Days 7, 16, 19, 24 and 28 post vaccination. Percentage of birds having sera with protective antibody levels was calculated (seroprotection level).

Statistical processing of results. Standard methods of statistical processing of variable sampling rates were used. The paper presents mean titres of sera antibodies and their standard deviations ($\bar{x} \pm s$), determined by at least 10 sample measured values ($n = 10$). Calculations and diagrams were made using Microsoft Office Excel.

STUDY RESULTS

Clinical observation of birds after ocular and oral vaccination. Some test chicks (10–15%), vaccinated ocularly by three vaccines, demonstrated ocular reactions expressed as one-eye serous conjunctivitis on Days 5–7 (Fig. 1, P. 21). These postvaccinal reactions resolved completely on Days 8–9 post vaccination.

Fig. 2. Assessment of ciliostasis dynamics caused by vaccines of different producers depending on application route



Chicks immunized orally by ARRIAH and Merial vaccines did not demonstrate any postvaccinal reactions. During the whole observation period no other clinical signs were noted.

Evaluation of vaccination effect on ciliary activity in trachea. After vaccination chicks were studied for ciliary activity on tracheal mucosa (C, %).

Results given in the diagram (Fig. 2) show that vaccines under study are little different from each other in onset time, strength and length of ciliostatic effect regardless of application route. The greatest ciliostatic effect was observed on Day 3–7 (5–9% of ciliostasis). Ciliary activity was completely restored up to Day 9–12 post vaccination.

Serological monitoring of vaccinated birds. Humoral response before vaccination and on Days 7, 16, 19, 24, 28 post vaccination were assessed. Based on primary data, seroprotection level was calculated for each group (percentage of immune birds per group which developed specific antibodies in response to vaccination in protective concentration).

Test results (Fig. 3) allow judging that vaccines under study are highly immunogenic because they ensure seroprotection level of more than 80%. In test groups vaccinated with ARRIAH vaccines ocularly and orally the number of birds with protective antibody titres was 82 and 99% on Day 16, correspondingly. Intervet vaccine, applied ocularly, ensured 100% protection on Day 19. A strong humoral immune response to ocular vaccination against ILT using Merial vaccine was 89% on Day 16. Herewith the protective antibody level in chicks after oral vaccination using Merial vaccine developed a week later.

DISCUSSION

Under conditions of intensive management and high flock density circulating field viruses attenuate the population resistance and open the gates for secondary opportunistic pathogenic bacterial microflora.

ILTV pathogenic effect consists of reproduction in tracheal cilia which stop purifying inhaled air from extraneous matter. Normally, thanks to coordinated ciliary beating on tracheal mucosa, the particles with mucus are moved towards larynx and throat and are swallowed together with saliva into esophagus. At this stage the infectious process is likely to be completely resolved, if it is not complicated with high dustiness, gas contamination and bacterial microflora [3, 5, 7, 9].

During the past 20 years in the USA, Australia and other countries ILT has been considered an emergent problem in broiler flocks, because previously the outbreaks of moderate ILT were reported exclusively in egg-laying flocks. There was no need in specific ILT prevention on broiler farms [4, 8, 10]. Herewith it is necessary to take into account that oral vaccination of broilers is more convenient when compared to an ocular one.

Previously the role of a "feral" vaccine ILT virus of embryonic origin was demonstrated in several outbreaks, occurred in broilers. ILT clinical manifestation was characterized by conjunctivitis, respiratory failure, high mortality and egg drop [4, 8, 10]. Comparison of cultural and embryo vaccines against ILT revealed a deficiency of an embryo strain, i.e. reversibility at passage 20 *in vivo* [6]. But a strict compliance with biosecurity rules on a poultry farm prevent transmission of a vaccine virus from vaccinated flocks to susceptible ones.

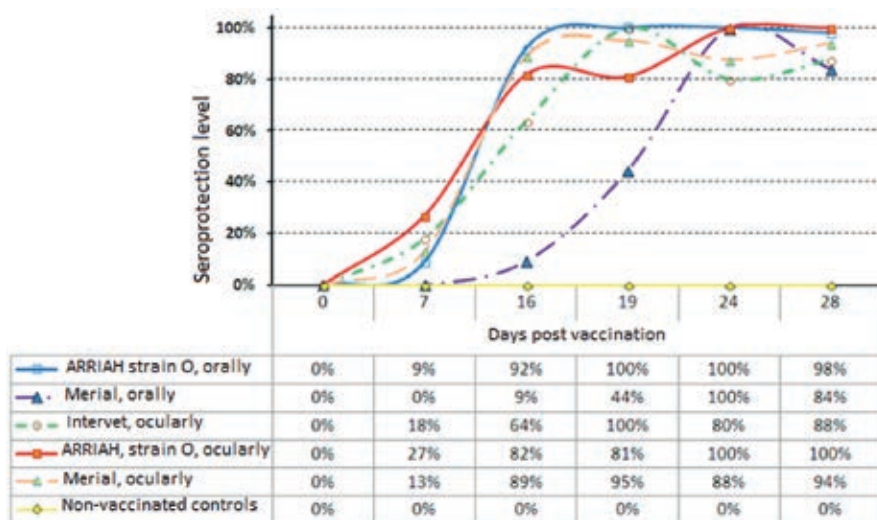


Fig. 3. Serological monitoring after oral and ocular vaccination by different vaccines

One eye serous conjunctivitis in 10–15% chicks in ocularly vaccinated groups was noted as a postvaccinal reaction during clinical observation.

Based on the results of the ciliostatic test, the cease in ciliary beating in 5–9% of epithelial area was identified, which is considered to be a moderate effect of vaccine strains regardless of the vaccination route. At the same time, as a rule, field isolates of different virulence cause ciliostasis in the whole surface of the tracheal mucosa [2, 3, 5, 7, 9].

When analyzing serological monitoring results, a sufficiently high immunogenicity of vaccines under study was established. The used seroprotection level, as opposed to seroconversion, imposes stricter requirements to vaccines, as it expresses the percentage of birds in vaccinated groups which developed protective levels of specific antibodies to a vaccine antigen. For ILT embryo vaccine, based on strain O (ARRIAH), a double value of positive-negative threshold of ELISA test-kit equal to 680 (2.832 Ig) was taken [1].

Thus seroprotection level in test groups exceeded the minimal value (80%) on Day 16 post vaccination. But immunity level in poultry vaccinated with Merial vaccine, showed a week delay in immunity development. This is likely associated with the fact that the vaccination dose both for ocular and oral vaccination is the same: 500 EID₅₀.

The virus reproduction sites are a respiratory tract and a conjunctiva [11, 12]; when swallowing the vaccine with drinking water the significant part of the virus gets to an esophagus and does not induce the immunity. Only small part of the virus, which settled down on the palate of the mouth cavity is immunogenic after reproduction. Thus it suggests that immunity development is delayed due to a low inoculation dose, when the poultry is immunized orally.

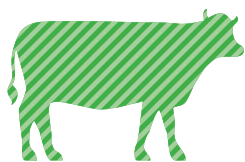
For reference one inoculation ocular ARRIAH strain O vaccine dose contains at least 500 EID₅₀, and the oral dose is 4 times bigger than the ocular one, at least 2,000 EID₅₀; which ensures rapid development of a strong immunity.

CONCLUSION

The results of the study suggest that live vaccines authorized in the RF are safe and immunogenic. Herewith the domestic vaccine is highly competitive with the imported analogues in humoral response development dynamics and strength.

REFERENCES

1. Studying possibilities of serological tests results use for assessment of immunity strength against infectious laryngotracheitis / A. V. Bocharnikov, V. Yu. Kulakov, T. V. Okovyta, Yu. V. Zuyev // Ветеринарна медицина-2004: міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2004. – Вип. 84. – р. 125–128.
2. Pokhvalny S. A., Kulakov V. Yu. Infectious laryngotracheitis virus effect on ciliary activity of avian tracheal mucosa // Achievements of young scientists to veterinary practice: proceedings of the IV International Scientific Conference devoted to 55 Anniversary of FGBI "ARRIAH" Post-Graduate Training. – Vladimir, 2016. – P. 45–50.
3. Bagust T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus // Avian Pathol. – 1986. – Vol. 15, No. 3. – P. 581–595.
4. Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program // Avian Dis. – 2008. – Vol. 52, No. 1. – P. 1–7.
5. Guy J. S., Barnes H. J., Morgan L. M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: Comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, No. 1. – P. 106–113.
6. Guy J. S., Barnes H. J., Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage // Avian Dis. – 1991. – Vol. 35, No. 2. – P. 348–355.
7. Infection of broilers with two virulent strains of infectious laryngotracheitis virus: Criteria for evaluation of experimental infections / A. Vagnozzi, S. M. Riblet, S. M. Williams [et al.] // Avian Dis. – 2015. – Vol. 59, No. 3. – P. 394–399.
8. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: A review / K. R. Menendez, M. García, S. Spatz, N. L. Tablante // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 2. – P. 108–117.
9. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus / S. Hayashi, Y. Odagiri, T. Kotani, [et al.] // Avian Dis. – 1985. – Vol. 29, No. 4. – P. 943–950.
10. Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis / N. C. Kirkpatrick, A. Mahmoudian, C. A. Colson [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35, No. 6. – P. 449–453.
11. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILT) vaccines / A. Rodríguez-Avila, I. Oldoni, S. Riblet, M. García // Avian Dis. – 2007. – Vol. 51, No. 4. – P. 905–911.
12. Replication characteristics of infectious laryngotracheitis virus in the respiratory and conjunctival mucosa / V. R. A. P. Reddy, L. Steukers, Y. Li [et al.] // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 5. – P. 450–457.



БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASES

УДК 636.084.1:636.22/28.053.2

ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ НОРМИРУЕМЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В МИНЕРАЛЬНОЙ И ОРГАНИЧЕСКОЙ ФОРМАХ НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И ОБМЕН ВЕЩЕСТВ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Е. Ю. Залубовская

Младший научный сотрудник, ФГБНУ «ДальЗНИВИ», г. Благовещенск, e-mail: dalznivilabbiohim@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты по живой массе, основным промерам молодняка крупного рогатого скота черно-пестрой породы, которые были получены в условиях молочного комплекса ООО «Приамурье» Тамбовского района Амурской области в 2017 г. Животных подбирали по методу пар-аналогов с учетом возраста, живой массы и физиологического состояния. Были сформированы 3 группы животных в возрасте 6 месяцев: 1 контрольная и 2 опытных, по 10 голов в каждой. Условия содержания молодняка всех групп были схожими. На основании полученных данных о количестве потребляемых и выделенных с фекалиями питательных веществ определены коэффициенты переваримости сырого протеина, сырого жира, безазотистых экстрактивных веществ и сырой клетчатки – питательных веществ рациона кормления, принятого в хозяйстве. Телятам контрольной группы скармливали основной рацион, принятый в хозяйстве, 1-й опытной с основным рационом скармливали нормируемые микроэлементы (йод, кобальт и селен) в минеральной форме, 2-й опытной – эти же микроэлементы в органической форме. Длительность опыта составила 180 дней. В конце опыта было установлено, что наиболее высокие показатели живой массы и среднесуточного прироста животных были во 2-й опытной группе. Аналогичная картина наблюдалась и по повышению коэффициентов переваримости питательных веществ. Также было доказано положительное влияние микроэлементов в органической форме на рост и развитие телят.

Ключевые слова: микроэлементы, телята, живая масса, переваримость, промеры.

UDC 636.084.1:636.22/28.053.2

INFLUENCE OF FEEDING NORMALIZED TRACE ELEMENTS IN MINERAL AND ORGANIC FORM ON GROWTH, DEVELOPMENT AND METABOLISM OF YOUNG CATTLE

Ye. Yu. Zalyubovskaya

Junior Researcher, FGBNU "DalZNIVI", Blagoveschensk, e-mail: dalznivilabbiohim@mail.ru

SUMMARY

The paper presents results of body weight and basic measurements of black-motley breed calves born at the OOO "Priamurye" dairy complex in the Tambov Rayon, the Amur Oblast in 2017. The animals were selected using the analogous pair method taking into account their age, body weight and health status. Three groups of six-month old animals were formed: one control group and two experimental groups with 10 animals in each. The housing conditions were similar in all the groups. Based on the obtained data on the amount of nutrients consumed and excreted with feces, the digestibility coefficients of crude protein, crude fat, nitrogen-free extracts and crude fiber – animal feeding nutrients used at the farm – were determined. The calves in the control group were fed the basic diet adopted in the farm, the animals in the first experimental group were fed the basic diet with addition of normalized trace elements (iodine, cobalt and selenium) in mineral form, the animals in the second experimental group were given the same trace elements in organic form. The experiment lasted for 180 days. The investigation revealed that the highest body weight and daily average growth values were observed in the second experimental group. Similar results were obtained with regard to increasing nutrient digestibility coefficients. Thus, the positive effect of trace elements in organic form on growth and development of calves was proved.

Key words: trace elements, calves, body weight, digestibility, measurement.

ВВЕДЕНИЕ

Залогом поддержания здоровья животных является сбалансированное минеральное питание. Амурская область относится к биогеохимической провинции с резким недостатком в биосфере ряда микроэлементов, в частности йода, селена и кобальта. Дефицит селена и йода составляет более 80–90%, а кобальта – 70% [3, 7].

Жизненно важные микроэлементы влияют на функции органов кроветворения, эндокринных желез, микрофлору пищеварительного тракта; участвуют в образовании ферментов, гормонов; способствуют синтезу витаминов В₁₂ и Е, тем самым регулируя обмен веществ; косвенно воздействуют на защитные реакции организма [6, 8].

Последствиями хронического дефицита микроэлементов являются низкое воспроизводство, рождение нежизнеспособного молодняка, преждевременная выбраковка животных, снижение продуктивности и качества продуктов животноводства [2, 4].

Недостаточное или несбалансированное с потребностями животных по основным питательным веществам кормление наносит большой экономический ущерб животноводству, является причиной различных заболеваний. Следовательно, полноценное обеспечение молодняка высококачественными кормами и необходимыми кормовыми добавками способствует оптимизации всех процессов, протекающих в организме, положительно влияет на рост, развитие, размножение, продуктивность, а также на качество продуктов, получаемых от животных [1, 9–11].

В связи с этим целью данной работы заключалась в изучении влияния различных форм йода, кобальта и селена на рост, развитие и обмен веществ молодняка крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены в 2017 г. на молодняке черно-пестрой породы крупного рогатого скота в условиях молочного комплекса ООО «Приамурье» Тамбовского района Амурской области. Для проведения научно-хозяйственного опыта по методу пар-аналогов с учетом возраста, живой массы и физиологического состояния были сформированы 3 группы 6-месячных животных: 1 контрольная и 2 опытных, по 10 голов в каждой. Телята контрольной группы получали основной рацион, принятый в хозяйстве; телятам 1-й опытной группы включали йод, селен и кобальт в минеральной форме; телятам 2-й опытной группы эти же микроэлементы скармливали в органической форме. Другие условия содержания молодняка всех групп были схожими. В 9-месячном возрасте у телят взяты промеры по Е. Я. Борисенко (2012). Опыт

продолжался в течение 180 дней. По завершении опыта определена переваримость кормов с применением государственных стандартов, рассчитаны коэффициенты переваримости (А. П. Калашников, 2003; Н. Г. Макарецев, 2012). Определен среднесуточный прирост животных (Н. А. Кравченко, 1963). Экспериментальные данные подвергали математической обработке при помощи программы Microsoft Excel, достоверность различий результатов устанавливали с помощью статистического критерия Стьюдента (*t*-критерий) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В конце опыта при изучении действия на организм телят микроэлементов в минеральной и органической форме наиболее высокий показатель среднесуточного прироста установлен во 2-й опытной группе животных: его значение на 5,0–9,2% превышало аналогичные показатели в контрольной и 1-й опытной группах.

Живая масса телят в 1-й опытной группе была выше, чем в контроле, на 4,6%, во 2-й – на 10,1% (табл. 1). Анализируя живую массу среди опытных групп, установили, что данный показатель во 2-й опытной группе достоверно увеличился на 2,05% ($p < 0,05$) в сравнении с 1-й группой.

Девятимесячные телята 2-й опытной группы характеризовались лучшими приростами и развитием, что подтверждалось показателями промеров животных (табл. 2).

В 1-й опытной группе показатели промеров были выше, чем в контрольной. Так, высота в холке была достоверно выше на 1,9% ($p < 0,01$), высота в крестце – на 1,6% ($p < 0,01$), косая длина туловища – на 1,3% ($p < 0,01$), ширина груди за лопатками – на 13,5% ($p < 0,001$), глубина груди – на 2,4% ($p < 0,01$), обхват груди – на 2,5% ($p < 0,001$), ширина в маклоках – на 4,7% ($p < 0,05$), ширина в тазобедренных сочленениях – на 3,5% ($p < 0,05$). Такие показатели промеров, как ширина в седалищных буграх и обхват пясти, в 1-й опытной группе по отношению к контролю были выше на 4,05 и 1,2% соответственно, однако являлись недостоверными.

Вторая опытная группа достоверно превосходила контрольную по всем показателям промеров: высота в холке – на 3,5% ($p < 0,001$), высота в крестце – на 2,8% ($p < 0,001$), косая длина туловища – на 3,3% ($p < 0,001$), ширина груди за лопатками – на 15,4% ($p < 0,001$), глубина груди – на 3,9% ($p < 0,001$), обхват груди – на 3,2% ($p < 0,001$), ширина в маклоках – на 5,7% ($p < 0,001$), ширина в тазобедренных сочленениях – на 6,2% ($p < 0,001$), ширина в седалищных буграх – на 9,4% ($p < 0,001$), обхват пясти – на 5% ($p < 0,05$).

Сравнив значения промеров 2-й опытной группы с 1-й, установили достоверные увеличения следую-

Таблица 1
Изменение живой массы телят за период опыта ($M \pm m$)

| Группа | Количество голов | Живая масса, кг | | Среднесуточный прирост, г | Результат в % к контролю |
|-------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|
| | | в начале опыта | в конце опыта | | |
| Контрольная | 10 | 146,4 ± 0,42 | 243,3 ± 0,48 | 538,3 | 100 |
| 1-я опытная | 10 | 146,2 ± 0,46 | 247,6 ± 1,63* | 563,3 | 104,6 |
| 2-я опытная | 10 | 146,0 ± 0,44 | 252,7 ± 0,75*** | 592,7 | 110,1 |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 2
Основные промеры телят в 9-месячном возрасте ($M \pm m$)

| Показатель, см | Группа | | |
|------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| | контрольная | 1-я опытная | 2-я опытная |
| Высота в холке | 102,8 ± 0,45 | 104,8 ± 0,49** | 106,4 ± 0,40*** |
| Высота в крестце | 106,1 ± 0,30 | 107,9 ± 0,39** | 109,1 ± 0,31*** |
| Косая длина туловища | 116,5 ± 0,39 | 118,1 ± 0,35** | 120,4 ± 0,36*** |
| Ширина груди за лопатками | 31,1 ± 0,32 | 35,3 ± 0,30*** | 35,9 ± 0,23*** |
| Глубина груди | 45,2 ± 0,24 | 46,3 ± 0,32** | 47,0 ± 0,28*** |
| Обхват груди | 137,0 ± 0,28 | 140,4 ± 0,49*** | 141,4 ± 0,46*** |
| Ширина в маклоках | 32,1 ± 0,44 | 33,6 ± 0,39* | 35,0 ± 0,31*** |
| Ширина в тазобедренных сочленениях | 34,0 ± 0,39 | 35,2 ± 0,31* | 36,1 ± 0,32*** |
| Ширина в седалищных буграх | 22,0 ± 0,41 | 23,1 ± 0,27 | 24,3 ± 0,31*** |
| Обхват пясти | 16,0 ± 0,29 | 16,2 ± 0,31 | 16,8 ± 0,28* |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 3
Коэффициенты переваримости питательных веществ ($M \pm m$)

| Показатель, % | Группа | | |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|
| | контрольная | 1-я опытная | 2-я опытная |
| Сырой протеин | 63,5 ± 0,33 | 65,7 ± 0,35*** | 66,9 ± 0,41*** |
| Сырой жир | 56,3 ± 0,68 | 58,4 ± 0,74* | 60,6 ± 0,72*** |
| Сырая клетчатка | 34,1 ± 0,69 | 37,2 ± 0,84* | 39,4 ± 0,71*** |
| БЭВ | 78,8 ± 0,97 | 81,1 ± 0,89 | 83,3 ± 1,11** |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

щих показателей: высота в холке – на 1,52% ($p < 0,05$), высота в крестце – на 1,11% ($p < 0,05$), косая длина туловища – на 1,94% ($p < 0,001$), ширина в маклоках – на 4,16% ($p < 0,05$), ширина в седалищных буграх – на 5,19% ($p < 0,01$). Остальные показатели промеров телят 2-й опытной группы также были выше, чем в 1-й. В частности, ширина груди за лопатками увеличилась на 1,69%, глубина груди – на 1,51%, обхват груди – на 0,71%, ширина в тазобедренных сочленениях – на 2,55%, обхват пясти – на 3,70%, однако значения данных показателей были не достоверны.

Для определения переваримости и степени использования питательных веществ рациона был проведен балансовый опыт (табл. 3).

Установлено, что коэффициенты переваримости питательных веществ в опытных группах были выше по сравнению с контролем. В 1-й опытной группе достоверно отличались следующие коэффициенты: переваримость сырого протеина повысилась на 3,46%, сырого жира – на 3,73%, сырой клетчатки – на 9,09%. Коэффициент переваримости безазотистых экстрактивных веществ (БЭВ) был выше на 2,91% (недостоверно). Коэффициенты переваримости 2-й опытной группы по отношению к 1-й повысились: сырого протеина –

на 1,82%, сырого жира – на 3,76%, сырой клетчатки – на 5,91%, БЭВ – на 2,71%. В результате произошедших изменений в развитии телят 1-й и 2-й групп данные коэффициенты являлись недостоверными.

При этом у телят 2-й опытной группы, получавших микроэлементы в органической форме, все показатели были выше в сравнении с контрольной. Разница в переваримости протеина составила 5,35% ($p < 0,001$), жира – 7,63% ($p < 0,001$), клетчатки – 15,54% ($p < 0,001$), БЭВ – 5,71% ($p < 0,01$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при скармливании нормируемых микроэлементов – йода, селена и кобальта – в минеральной и органической формах молодняку крупного рогатого скота черно-пестрой породы выявлено их положительное влияние на рост и развитие телят. Установлено, что включение в принятый хозяйством рацион кормления микроэлементов в органической форме в большей степени способствовало повышению живой массы телят и увеличению среднесуточного прироста, чем ввод микроэлементов в минеральной форме. При этом также улучшилась переваримость питательных веществ корма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние скармливания минерально-витаминной кормовой добавки на молочную продуктивность первотелок / Е. С. Дубкова, Т. А. Краснощекова, Е. В. Туаева [и др.] // Зоотехния. – 2011. – № 12. – С. 10–11.
2. Донник И. М. Влияние экологических факторов на организм животных // Ветеринария. – 2007. – № 6. – С. 38–42.
3. Залюбовская Е. Ю., Герасимович А. И. Оптимизация микроминерального питания молодняка крупного рогатого скота и свиней путем использования сапропелевых гуматов // Дальневосточный аграрный вестник. – 2016. – № 4 (40). – С. 102–106.
4. Исаева Е. Микроэлементы в органической форме – залог здорового питания коров // Комбикорма. – 2016. – № 4. – С. 53–56.
5. Кокшарова Т. Е., Цыдыпов Ц. Ц. Методические указания по математической обработке результатов исследования с использованием табличного процессора Excel. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2002. – 40 с.
6. Кузнецов С. Г. Микроэлементы в кормлении животных // Животноводство России. – 2003. – № 3. – С. 16–18.
7. Плавинский С. Ю., Пустовой С. А. Действие различных форм I, Fe и Se на рост и развитие молодняка крупного рогатого скота // Зоотехния. – 2009. – № 5. – С. 10–11.
8. Применение хелатов в животноводстве / З. Дункель, Х. Клуге, Й. Шпильке, К. Эдер // Комбикорма. – 2008. – № 1. – С. 77–78.
9. Физиологические подходы к оптимизации микроминерального питания молодняка крупного рогатого скота / С. Н. Кочегаров, Т. А. Краснощекова, Р. Л. Шарвадзе [и др.] // Зоотехния. – 2012. – № 5. – С. 13–14.
10. Харламов И. С., Чепелев Н. А. Влияние хелатных микроэлементов на протекание обменных процессов в организме новотельных высокопродуктивных коров // Вестник Курской гос. с.-х. академии. – 2013. – № 7. – С. 45–46.
11. Харламов И. С., Чепелев Н. А. Минеральный обмен у коров при использовании хелатных соединений микроэлементов // Вестник Курской гос. с.-х. академии. – 2013. – № 9. – С. 64–66.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМА ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО ДЕРМАТИТА (НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА) КРС В ПОЛЕВЫХ ОБРАЗЦАХ ОТ КРС НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А. В. Кононов¹, А. В. Спрыгин², С. В. Кононова³, А. А. Нестеров⁴, П. В. Прутников⁵, Е. Е. Артюхова⁶, Е. С. Кострова⁷, И. Н. Шумилова⁸

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

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

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

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

⁵ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁶ Ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: artuhova@arriah.ru

⁷ Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kostrova@arriah.ru

⁸ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shumilova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты лабораторных исследований проб патологического и биоматериала на наличие генома вируса заразного узелкового дерматита с помощью тест-системы «Заразный узелковый дерматит ПЦР-РВ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Пробы от крупного рогатого скота были получены в 2016–2017 гг. из 16 регионов Российской Федерации. Исследовано 848 образцов проб стабилизированной крови, сыворотки крови, соскобов кожи (нодулы), носовых смывов. При прижизненной диагностике вирус заразного узелкового дерматита КРС был выявлен в носовых смывах (29,2%), сыворотке крови (19,5%) и стабилизированной крови (24,4%). При посмертной диагностике геном вируса заразного узелкового дерматита КРС выявляли в пробах пораженных кожных покровов в 77,7% случаев. В пробах трахеи, селезенки и от аборттированных плодов геном вируса выявлен не был. Таким образом, при подозрении на заразный узелковый дерматит при прижизненной диагностике необходимо в первую очередь исследовать пробы крови и носовых смывов, а при посмертной диагностике – нодулы (бугры).

Ключевые слова: заразный узелковый дерматит, ПЦР в режиме реального времени, геном, полевые образцы.

UDC 619:616.98:578.821.2:616-076

DETECTION OF LUMPY SKIN DISEASE VIRUS GENOME IN FIELD SAMPLES COLLECTED FROM CATTLE IN THE RUSSIAN FEDERATION

A. V. Kononov¹, A. V. Sprygin², S. V. Kononova³, A. A. Nesterov⁴, P. V. Prutnikov⁵, Ye. Ye. Artyukhova⁶, Ye. S. Kostrova⁷, I. N. Shumilova⁸

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

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

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

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

⁵ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir

⁶ Leading Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: artuhova@arriah.ru

⁷ Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kostrova@arriah.ru

⁸ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shumilova@arriah.ru

SUMMARY

Results of laboratory tests of pathological and biological material samples for lumpy skin disease virus genome with the FGBI "ARRIAH" lumpy skin disease real-time PCR test system are presented. Samples were collected from cattle in 16 regions of the Russian Federation in 2016–2017. A total of 848 stabilized blood, serum, skin (nodule) scrape, nasal washing samples were tested. In the process of antemortem diagnosis lumpy skin disease virus genome was detected in nasal washings (29.2%), serum (19.5%) and stabilized blood (24.4%). Lumpy skin disease virus genome was detected in skin lesion samples (77.7% of cases) during postmortem diagnosis. No lumpy skin disease virus genome was detected in trachea, spleen and aborted fetus samples. Thus, in case of lumpy skin disease suspicion serum and nasal washing samples shall be tested first for antemortem diagnosis, while nodules (lumps) shall be primarily tested for postmortem diagnosis.

Key words: lumpy skin disease, real-time PCR, genome, sample.

ВВЕДЕНИЕ

Заразный узелковый дерматит (нодулярный дерматит, бугорчатка) крупного рогатого скота (ЗУД КРС) – особо опасная трансграничная инфекционная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, образованием кожных узлов (нодул, бугров), лимфаденитом, поражением конъюнктивы, слизистых оболочек органов дыхания, пищеварения и воспроизводства [10, 21].

Возбудителем заразного узелкового дерматита является ДНК-содержащий оболочечный вирус, относящийся к семейству *Poxviridae* рода *Capripoxvirus*, к которому принадлежат родственные ему возбудители оспы овец и оспы коз [7]. Геном вируса представлен двуцепочечной ДНК длиной 151 тыс. пар оснований [9].

Заболеванию подвержены крупный рогатый скот и буйволы [5], однако среди КРС наибольшей уязвимостью обладают коровы молочного направления, причем уровень заболеваемости может колебаться от 3 до 80% [12, 18, 21], что свидетельствует о возможной роли других, в настоящее время пока не изученных факторов, которые влияют на тяжесть клинических признаков.

Наиболее распространенным путем заражения животных вирусом ЗУД являются укусы кровососущих насекомых [4, 14, 15].

Все вспышки ЗУД с клиническими признаками инфекции подлежат обязательной нотификации в МЭБ. В настоящее время, по данным МЭБ, вспышки инфекции зафиксированы в Албании, Македонии, Греции, Турции и других странах [3, 6, 8].

В Российской Федерации болезнь впервые зарегистрирована в 2015 г. на территории Республики Дагестан [1]. В 2016 г. на территории страны отмечено 313 вспышек инфекции в 17 субъектах [22]. Всего заболело 17 853 головы КРС, пало 1559, уничтожено 30; показатель заболеваемости составил 10%, летальности – 8,7%, смертности – 0,9%. В 2017 г. нотифицировано 43 вспышки в 6 субъектах РФ.

Болезнь наносит значительный экономический ущерб скотоводству, так как вызывает существенное снижение молочной продуктивности у коров, вплоть до полной агалактии, потерю живой массы тела, накладывает ограничения на торговлю живыми животными и продуктами их убоя. У стельных животных отмечают аборт, приводящие к временному или постоянному бесплодию [13].

При генерализованной форме болезни на теле животного появляются узелки (нодулы) диаметром 2–7 см, в основном на голове, шее, вымени и в промежности. На отдельных участках тела происходит слияние узелков и образование язв. Пораженные участки кожи болезненны для животных, что ухудшает их состояние и снижает продуктивность [10]. У быков вирус может экскретироваться со спермой в течение длительного времени [17].

Беспрецедентное распространение вируса ЗУД КРС, в том числе по причине латентного вирусоносительства, требует разработки системных подходов для раннего выявления данного заболевания и мониторинга с целью недопущения его распространения и снижения экономических потерь при развитии болезни. Поскольку ЗУД КРС является недостаточно изученным заболеванием, необходимо установить, какие образцы должны быть использованы для ранней и достоверной детекции вируса в полевых условиях.

В связи с этим целью настоящей работы было выявление ДНК вируса ЗУД КРС с помощью разработанной ранее тест-системы «Заразный узелковый дерматит ПЦР-РВ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в образцах биологического материала, отобранных от живых животных с клиническими признаками заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Образцы для исследования поступали из ряда животноводческих хозяйств, где регистрировали ЗУД КРС в 2016–2017 гг. Использовали пробы биоматериала, отобранные от живых и павших животных с клиническими признаками заболевания ЗУД: стабилизированную кровь, сыворотку крови, соскобы кожи (нодулы), назальные и окулярные смывы, молоко, лимфатические узлы, легкие, трахею, селезенку и абортированные плоды. С момента идентификации подозрительных на заболевание животных пробы отбирали и доставляли в лабораторию в охлажденном состоянии в течение 24 ч.

Выделение ДНК. Пробоподготовку проводили в условиях лаборатории. Для исследования использовали сыворотку, стабилизированную кровь и 5–10%-ю суспензию биоматериала.

Для получения суспензии образец биологического материала гомогенизировали до кашицеобразного состояния с использованием стерильной фарфоровой ступки и пестика. Затем в ступку добавляли воду, свободную от нуклеаз, для получения 10%-й суспензии и перемешивали с гомогенатом. ДНК выделяли с помощью AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Выявление генома вируса ЗУД КРС проводили с помощью тест-системы для выявления генома полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Заразный узелковый дерматит ПЦР-РВ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

ПЦР в режиме реального времени осуществляли с помощью Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) согласно инструкции к набору. Реакцию проводили согласно следующему протоколу: активация 95 °С – 10 мин; 40 циклов – 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин. Результаты интерпретировали на основании интенсивности флуоресценции. Наличие ДНК вируса ЗУД в образце считали подтвержденным и пробу положительной, если значение *Ct* было не более 35; отрицательной – если значение *Ct* отсутствовало или было более 37.

Наличие генома вируса ЗУД в пробах дополнительно подтверждали путем вирусовыделения и секвенирования фрагмента гена RPO30 с помощью генетического анализатора (Applied Biosystems, USA) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За 2016–2017 гг. в референтной лаборатории болезни КРС было исследовано 848 проб биологического материала из 16 регионов Российской Федерации (Астраханская, Волгоградская, Воронежская, Рязанская, Ростовская, Самарская, Саратовская, Оренбургская, Тамбовская области, Краснодарский и Ставропольский края, Республики Дагестан, Калмыкия, Башкортостан, Карачаево-Черкесская, Чеченская Республики) от КРС с клиническими признаками заболевания.

Геном вируса ЗУД КРС был выявлен в 268 пробах, что составило 31,6% от общего числа исследованных проб (см. таблицу).

При исследовании проб, отобранных от живых животных, наиболее часто вирус ЗУД КРС выявляли в носовых смывах (29,2%), сыворотке крови (19,5%) и стабилизированной крови (24,4%).

При исследовании проб патологического материала геном вируса ЗУД КРС был выявлен в пробах пораженных кожных покровов (нодулах) в 77,7% случаев. В пробах трахеи, селезенки и от абортированных плодов геном вируса ЗУД КРС выявлен не был.

Дополнительно было проведено исследование 11 проб молока от КРС с клиническими признаками болезни, из которых в 6 пробах был выявлен геном вируса ЗУД КРС; из 5 проб лимфоидной ткани в 2 пробах выявлен геном вируса; из 6 проб легких в 3 пробах выявлен геном ЗУД КРС.

Следует отметить, что вирус ЗУД имеет тропизм к клеткам эпителия. При подкожном и внутрикожном заражении у КРС спустя 4–7 сут возникает воспалительная реакция, охватывающая эпидерму, дерму и нижележащие мышцы. В образующихся бугорках скапливается экссудат, а затем развивается некроз. Генерализация процесса происходит на 7–19-е сут после заражения животных и характеризуется лихорадкой. Вирус в крови появляется на 3–4-е сут после подъема температуры тела и массового образования бугорков. С кровью он разносится по организму, проникает в слизистые ротовой полости, носа, глаз, влагалища, препуция, в слюнные и молочные железы, семенники и другие органы и ткани, вызывает тромбоз сосудов и коагуляционный некроз окружающих тканей. Репродукция вируса в указанных органах приводит к появлению новых некротизирующихся кожных узлов (бугорков), развитию генерализованного лимфаденита, отеку конечностей, поражению глаз и слизистых оболочек органов дыхания, воспроизводства и пищеварения.

Постановка диагноза основывается на анализе эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений. Для установления окончательного диагноза проводят лабораторные исследования. В качестве материала для выявления и/или выделения вируса рекомендуется использовать пораженные кожные участки, лимфоидную ткань, носовые и окулярные смывы, стабилизированную кровь (сыворотку), образцы семени или молока.

В настоящее время для диагностики ЗУД КРС используют молекулярно-генетические методы. Диагноз на ЗУД считается установленным, если в пробах от больных или с подозрением на заболевание животных обнаружен вирус ЗУД КРС, или его антиген, или геном. С этой целью используется метод ПЦР [2].

В соответствии с вышесказанным в данной работе представлены результаты исследования полевых проб, отобранных от живых и вынужденно убитых животных, на наличие генома вируса ЗУД КРС с помощью тест-системы «Заразный узелковый дерматит ПЦР-РВ». Оперативная лабораторная диагностика ЗУД, особенно у живых животных, подозреваемых в заболевании, имеет большое значение для подтверждения предположительного диагноза и своевременных действий по предотвращению распространения вируса. Однако недостаточная изученность биологических свойств вируса ЗУД и его патогенеза требует объединения усилий

Таблица
Выявление генома ЗУД КРС в полевых образцах биоматериала от КРС

| Вид материала | Общее количество проб | Из них положительных | % положительных проб |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Нодулы (бугры) | 108 | 84 | 77,7 |
| Кровь стабилизированная | 417 | 102 | 24,4 |
| Сыворотка крови | 128 | 25 | 19,5 |
| Носовые смывы | 195 | 57 | 29,2 |

лабораторий и практикующих ветеринарных врачей для более глубокого понимания характерных особенностей данного вируса.

Геном вируса ЗУД наиболее часто регистрировали в кожных поражениях (77,7% проб), что согласуется с результатами других исследований и подтверждает, что у вируса выраженный тропизм к кожному эпителию [16]. К тому же E. S. Turpurainen и соавт. показали, что с помощью ПЦР геном в крови животных выявляют с момента появления нодул (бугров) [19]. Среди остальных образцов биологического материала геном вируса выявляли в 19–29% проб. Генетический материал вируса также выявляли в пробах легких, лимфоузлов и молока, однако из-за ограниченного количества проб невозможно провести однозначную статистическую оценку этих результатов. Важно отметить, что пробы от животных поступали в период начала развития клинических признаков, что могло сказаться на результативности выявления вируса ЗУД. Например, отсутствие генома вируса в большинстве проб (смывы, сыворотка крови и кровь) может быть объяснено тем, что вирус еще не успел накопиться в достаточной концентрации, чтобы его экскреция в биологических жидкостях превышала предел чувствительности тест-системы. Более того, S. Babiuk и соавт. установили, что при экспериментальном заражении экскреция вируса со слизистых поверхностей начинается после развития нодул (бугров), причем ДНК вируса в смывах выявляли в течение нескольких дней в слабой концентрации, а вiremия составляла около 9 сут и характеризовалась непостоянством наличия вируса на протяжении эксперимента [16, 19]. Данные свойства, возможно, объясняют слабую трансмиссию вируса между животными в условиях отсутствия лета насекомых-переносчиков.

Для анализа полученных с помощью тест-системы результатов использовали метод ПЦР с электрофоретической детекцией, рекомендованный МЭБ (классический метод). Анализ показал, что результаты совпадали с методом, предложенным D. C. Ireland и Y. S. Binpal [11], в 96% случаев, а в 4% классическим методом ДНК не выявили. Это логично, поскольку общепризнано, что классическая ПЦР обладает меньшей чувствительностью и на ранних стадиях инфекции концентрация вируса находится в диапазоне, не превышающем уровень чувствительности данного метода. Подтверждением может служить тот факт, что E. S. Turpurainen и соавт. [19] ранее установили период вiremии 4–6 сут при использовании классического метода ПЦР, тогда как S. Babiuk и соавт. [16] получили данные с помощью ПЦР в режиме реального времени. Последующий анализ сомнительных проб (23 проб сыворотки и смывов)

при помощи методов вирусыведения и секвенирования (данные не представлены) подтвердил наличие вируса и тем самым свидетельствовал о более высокой чувствительности полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, осуществленной с помощью тест-системы «Заразный узелковый дерматит ПЦР-РВ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), по сравнению с классической ПЦР. Необходимо отметить, что результатом вирусыведения, которое, как правило, успешно для вируса ЗУД [1], является детекция жизнеспособных вирионов, тогда как с помощью ПЦР выявляется ДНК генома вируса без дифференциации жизнеспособности, что является более предпочтительным при постановке диагноза, так как даже наличие нежизнеспособных вирионов в пробах от животных может свидетельствовать об инфицировании.

Следует отметить, что не все инфицированные животные могут иметь симптомы заболевания либо они могут быть слабо выражены, что создает сложность в дифференциальной диагностике от герпесвируса КРС 2-го типа (псевдоузелкового дерматита / герпетического маммилита). В связи с этим при формировании мониторинговых исследований необходимо учитывать и клинически здоровых животных в зонах высокого риска, поскольку они могут находиться в инкубационном периоде или переболеть без видимых симптомов [19] и способствовать передаче вируса через кровососущих насекомых. Это имеет особое практическое значение, так как при контроле эпизоотической ситуации по заразному узелковому дерматиту КРС проводится прижизненная диагностика, что позволяет значительно снизить экономический ущерб от заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из 848 исследованных проб положительный результат был получен в 268, что составляет 31,6% от общего числа. Наиболее часто вирус ЗУД КРС выявляли в следующих пробах: кожные поражения (77,7%), носовые смывы (29,2%), сыворотка крови (19,5%) и стабилизированная кровь (24,4%). Также геном вируса обнаружен в молоке, лимфоидной ткани и легких. В пробах трахеи, селезенки и от абортированных плодов геном вируса ЗУД КРС выявлен не был.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Культурально-биологические свойства возбудителя нодулярного дерматита крупного рогатого скота, выделенного на территории Российской Федерации в 2015 году / А. В. Кононов, С. В. Кононова, И. Н. Шумилова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 3. – С. 8–18.
2. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота / А. В. Мищенко, В. А. Мищенко, А. В. Кононов [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2015. – № 5. – С. 3–6.
3. Al-Salih K. A., Hassan I. Q. Lumpy skin disease in Iraq: Study of the disease emergence // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2015. – Vol. 62, No. 5. – P. 457–462.
4. Carn V. M., Kitching R. P. An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling) // *Epidemiol. Infect.* – 1995. – Vol. 114, No. 1. – P. 219–226.
5. Elhaig M. M., Selim A., Mahmoud M. Lumpy skin disease in cattle: Frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 2017. – Vol. 84, No. 1. – doi: 10.4102/ojvr.v84i1.1393.
6. Emergence of lumpy skin disease in Greece, 2015 / K. E. Tsaioudi, S. E. Antoniou, P. Iliadou [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2016. – Vol. 63, No. 3. – P. 260–265.
7. Family Poxviridae / R. M. Buller, B. M. Arif, D. N. Black [et al.] // *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* / ed. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff [et al.]. – Oxford: Elsevier Inc., 2005. – P. 117–133.
8. First cases of lumpy skin disease reported in the EU // *Vet. Rec.* – 2015. – Vol. 177, No. 9:218. – doi: 10.1136/vr.h4668.
9. Genome of lumpy skin disease virus / E. R. Tulman, C. L. Afonso, Z. Lu [et al.] // *J. Virol.* – 2001. – Vol. 75, No. 15. – P. 7122–7130.
10. Hunter P., Wallace D. Lumpy skin disease in Southern Africa: A review of the disease and aspects of control // *J. S. Afr. Vet. Assoc.* – 2001. – Vol. 72, No. 2. – P. 68–71.
11. Ireland D. C., Binopal Y. S. Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR // *J. Virol. Methods.* – 1998. – Vol. 74, No. 1. – P. 1–7.
12. Long-term changes in the spatial distribution of lumpy skin disease hotspots in Zimbabwe / S. Swiswa, M. Masocha, D. M. Pfukenyi [et al.] // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2017. – Vol. 49, No. 1. – P. 195–199.
13. Lumpy skin disease in Jordan: Disease emergence, clinical signs, complications and preliminary-associated economic losses / S. M. Abutarbush, M. M. Ababneh, I. G. al Zoubi [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2015. – Vol. 62, No. 5. – P. 549–554.
14. Lumpy skin disease: Attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle / E. S. M. Tuppurainen, E. H. Venter, J. A. W. Coetzer, L. Bell-Sakyi // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2015. – Vol. 6, No. 2. – P. 134–140.
15. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / C. M. Chihota, L. F. Rennie, R. P. Kitching, P. S. Mellor // *Epidemiol. Infect.* – 2001. – Vol. 126, No. 2. – P. 317–321.
16. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle // S. Babiuk, T. R. Bowden, G. Parkyn [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2008. – Vol. 55, No. 7. – P. 299–307.
17. Sites of persistence of lumpy skin disease virus in the genital tract of experimentally infected bulls / C. H. Annandale, P. C. Irons, V. P. Bagla [et al.] // *Reprod. Domest. Anim.* – 2010. – Vol. 45, No. 2. – P. 250–255.
18. Temporal and spatial distribution of lumpy skin disease (LSD) outbreaks in Mashonaland West Province of Zimbabwe from 2000 to 2013 / C. Gomo, K. Kanonhuwa, F. Godobo [et al.] // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2017. – Vol. 49, No. 3. – P. 509–514.
19. Tuppurainen E. S. M., Venter E. H., Coetzer J. A. W. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 2005. – Vol. 72, No. 2. – P. 153–164.
20. Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus / C. E. Lamien, C. Le Goff, R. Silber [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2011. – Vol. 149, No. 1–2. – P. 30–39.
21. Woods J. A. Lumpy skin disease: A review // *Trop. Anim. Health Prod.* – 1988. – Vol. 20, No. 1. – P. 11–17.
22. World Organisation for Animal Health / OIE. – URL: <http://www.oie.int/>.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ТИОНОНТРИТА-S ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Е. В. Тяпкина¹, М. П. Семенов², Е. В. Кузьмина³, А. А. Абрамов⁴

¹ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар, e-mail: jane-tyapkina@yandex.ru

² Заведующий отделом, доктор ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар

³ Ведущий научный сотрудник, доктор ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар

⁴ Аспирант, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар

РЕЗЮМЕ

Представлены данные по изучению эффективности комплексного препарата тиононрит-S при профилактике метаболических нарушений функции печени крупного рогатого скота. Назначение препарата коровам 6–7-го месяца сухостойного периода в течение двух недель в дозе 0,3 г/кг массы тела корректирует биохимический гомеостаз и профилактирует развитие патогенетических сдвигов, возникающих при метаболических нарушениях функции печени. Нивелирование симптоматики у коров происходит на 12–14-е сут, профилактическая эффективность составляет 90%. В контрольной группе симптомы заболевания отмечались у 55% коров. Назначение тиононрит-S способствовало повышению протеинсинтетической функции печени. Так, повышение уровня общего белка в опытной группе составило 8,8% от фоновых показателей. Повышение уровня глюкозы относительно фона в опытной группе составило 26,6%, в контроле этот показатель снижился на 6,7%. Препарат восстанавливал функциональную и барьерную функции печени, нормализовал ферментообразующую функцию. Уровень аланинаминотрансферазы на конец

опыта в опытной группе был меньше показателей контроля в 1,8 раза, уровень аспаратаминотрансферазы был ниже отрицательного контроля в 1,6 раза. Положительное влияние тиононрит-S отмечалось и в отношении пигментного обмена: концентрация общего билирубина в опытной группе коров была в пределах физиологических границ ($4,28 \pm 0,55$ мкмоль/л), тогда как в контрольной группе выявлялась гипербилирубинемия, в 1,6 раза превышающая верхненормальные значения. Улучшение биохимических показателей в опытной группе коррелировало со снижением уровня молекул средней массы и продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот. Снижение уровня молекул средней массы у опытных коров на длине волны $\lambda = 254$ нм составило 8,3% и на длине волны $\lambda = 280$ нм – 10%. В опытной группе уровень диеновых конъюгатов снижился на 14,3% относительно фоновых показателей, кетодиенов – на 26,3%, малонового диальдегида – на 8,9% и флуоресцирующих оснований Шиффа – на 18,2%.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, тиононрит-S, профилактика, печень.

UDC 619:615.356:636.22/.28:616.36

EFFICACY OF THIONONTRITE-S FOR PREVENTION OF METABOLIC LIVER DISEASE IN CATTLE

Ye. V. Tyapkina¹, M. P. Semenenko², Ye. V. Kuzminova³, A. A. Abramov⁴

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute, Krasnodar, e-mail: jane-tyapkina@yandex.ru

² Head of Department, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute, Krasnodar

³ Leading Researcher, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute, Krasnodar

⁴ Post-Graduate Student, Krasnodar Research Veterinary Institute, Krasnodar

SUMMARY

The study data of the efficacy of thionontrite-S-complex preparation in the prevention of metabolic liver disease of cattle are presented. Administration of the preparation to 6–7-month-old cows in dry period for two weeks at a dose of 0.3 g/kg of body weight corrects biochemical homeostasis and prevents the development of pathogenetic shifts during metabolic liver disease. Disease symptoms faded on Day 12–14, preventive efficacy was 90%. In the control group 55% of cows demonstrated the disease symptoms. The use of thionontrite-S promoted an increase in the protein-synthesizing function of the liver; in particular, an increase in the level of total protein was 8.8% against the baseline indicators in the experimental group. The increase in glucose level with respect to baseline indicators in the experimental group was 26.6%, in the control group this parameter decreased by 6.7%. The preparation restored functional and barrier properties of the liver, normalized the enzyme-forming function. At the end of the experiment the level of alanine aminotransferase in the first group was 1.8 times

less than the control levels, the level of aspartate aminotransferase was 1.6 times lower than the negative control levels. The positive effect of thionontrite-S was also observed with regard to pigment metabolism; the concentration of total bilirubin in the experimental group was within physiological limits (4.28 ± 0.55 μ M/l), whereas in the control group hyperbilirubinemia was 1.6 times higher than the upper limit of normal. Improvement of biochemical parameters in the experimental group correlated with a decrease in the level of medium-mass molecules and peroxidation products of unsaturated fatty acids. The decrease in the level of average weight molecules in experimental cows at a wavelength $\lambda = 254$ nm was 8.3% and at a wavelength $\lambda = 280$ nm – 10%. In the experimental group, the level of diene conjugates decreased by 14.3% with regard to baseline indicators, ketodienes – by 26.3%, malondialdehyde – by 8.9% and fluorescent Schiff bases – by 18.2%.

Key words: cattle, thionontrite-S, prevention, liver.

ВВЕДЕНИЕ

В современном животноводстве для достижения стабильных производственных показателей используется интенсивный высококонцентратный тип кормления. В этом случае в организме происходит усиленный синтез белка, при котором печень испытывает колоссальные нагрузки. На их фоне недостаток минеральных веществ, бессистемное применение антибиотиков и других химиотерапевтических средств, а также кормление недоброкачественными кормами, в которых присутствуют микотоксины, ксенобиотики и другие токсиканты, приводят к нарушениям функциональной активности гепатоцитов. В печени развиваются дегенеративные изменения, снижается ее барьерная функция, происходит тотальное нарушение обмена веществ, что в конечном итоге приводит к снижению естественной резистентности, повышенной заболеваемости, потере продуктивности и выбраковке животного. Глубокие нарушения обмена веществ способствуют накоплению в организме токсических метаболитов, вызывая значительное изменение биохимических констант гомеостаза [3, 4, 6].

Клиническое проявление метаболических нарушений функции печени у крупного рогатого скота отмечают в период повышенной нагрузки на орган – с 6–7-го месяца сухостоя и до отела, а также во время максимального глюконеогенеза (в период максимальной лактации). При дальнейшем высококонцентратном типе кормления и нарушении условий содержания животных важнейший орган выведения токсинов и их метаболитов из организма – печень – перестает справляться с повышенной нагрузкой, что способствует возникновению более тяжелых заболеваний: гепатопатий, жирового гепатоза, циррозов и др. [1, 3].

Повсеместно фиксируется высокий уровень выбраковки (30% и выше) коров 1–3-й лактации вследствие метаболических заболеваний (кетоз, ацидоз рубца, жировые гепатозы и др.). Доля гибели либо вынужденного убоя коров в ранний послелектельный период составляет около 40% от общего показателя выбытия [1, 2].

Поскольку избежать стрессовых влияний на организм животных практически невозможно, остается лишь воздействовать на него в период повышенной нагрузки с целью удержать организм на стадии адаптации и предотвратить наступление истощения. В связи с этим целесообразно назначение с профилактической целью патогенетических комплексных средств, оказывающих адсорбирующее и детоксикационное действие, позволяющих снизить повреждающее воздействие на печень и активировать репаративные процессы в гепатоцитах [5, 7].

В настоящее время проведены значительные экспериментальные исследования по использованию природных алюмосиликатов слоистого строения (группы монтмориллонита) для нормализации обменных процессов у животных [2, 4, 5]. В ходе их установлено, что монтмориллониты обладают целым рядом уникальных особенностей, характеризующихся сорбирующими, буферными, ионообменными и каталитическими свойствами, и содержат в своем составе почти все необходимые для жизнедеятельности организма животных и птицы минеральные макро- и микроэлементы [5].

В целях потенцирования сорбционных и детоксикационных свойств природного алюмосиликата на основе нонтронита (железистая разновидность монтмориллонита) в отделе фармакологии Краснодарского

НИВИ был разработан новый препарат – тиононрит-5 и проведен опыт по изучению его эффективности при профилактике метаболических нарушений функции печени крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение профилактической эффективности тиононрита-5 при метаболических нарушениях функции печени определяли в сравнении с положительным (препарат-аналог) и отрицательным контролем на трех группах коров ($n = 20$) 6–7-го месяца сухостойного периода, подобранных с учетом массы тела и продуктивности.

В первой группе опытных коров тиононрит-5 назначали в течение двух недель в дозе 0,3 г/кг массы тела, во второй опытной (положительный контроль) – бентонит в той же дозировке, животным третьей (контрольной) группы лечение не проводили. Условия содержания (в типовых корпусах, беспривязно-выгульное) и рацион всех коров (комбикорм, сенаж, силос, сено, поение из автопоилок) были аналогичными, хозяйство – благополучно по инфекционным и инвазионным заболеваниям.

В течение эксперимента проводили ежедневный клинический контроль, учитывая симптомы заболевания; оценивали физиологическое состояние по биохимическим показателям крови в начале и конце опыта. Для синдрома метаболических нарушений функции печени помимо клинического проявления (угнетение, снижение реакции на корм, редкая и вялая жвачка, гипотония, диспептические проявления, болезненность печени при перкуссии и пальпации, тусклость и ломкость шерстного покрова), не всегда или слабо выраженного, в большей степени характерно изменение биохимических показателей, в частности маркеров патологии печени – трансаминаз (аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, билирубина и тимоловой пробы).

Одним из факторов воздействия различных эндо- и экзотоксинов на печеночные клетки является повышение содержания молекул средней массы (МСМ) в крови с максимумом в период разгара интоксикации. Изучение уровня МСМ значительно расширяет возможности углубленного понимания процессов, протекающих в организме при различного рода метаболических изменениях, возникающих вследствие нарушения обмена веществ.

Учитывая, что уровень МСМ считается универсальным маркером интоксикации и является одним из наиболее информативных и доступных способов оценки выраженности интоксикации и эффективности лечения при многих метаболических состояниях организма, в ходе эксперимента определяли уровень среднемолекулярных пептидов в сыворотке крови подопытных животных на различных длинах волн. Уровень эндогенной интоксикации определяли по методу Н. И. Габриэляна и В. И. Липатовой.

В генезе многих состояний организма универсальным неспецифическим звеном является повреждение мембран клеток в результате перекисного окисления липидов, поэтому концентрация перекисных продуктов является одним из важнейших критериев, свидетельствующих о гомеостазе всех систем организма. В связи с этим изучали продукты перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в крови коров: пер-

вичные – диеновые конъюгаты (ДК) и кетодиены (КД), вторичные – малоновый диальдегид (МДА), конечные – флуоресцирующие основания Шиффа (ОШ).

Оценку показателей системы «перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты» проводили в соответствии с «Методическим пособием по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных» (ВНИВИПФиТ, 1997).

Лабораторные биохимические исследования проводили на автоматизированном биохимическом анализаторе Vitalab Flexor (Нидерланды).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения эксперимента была установлена профилактическая эффективность тиононритра-S при метаболических нарушениях функции печени у коров. Применение препарата в определенной степени корректировало биохимический гомеостаз и профилактировало развитие патогенетических сдвигов, возникающих при метаболических нарушениях печени, что выражалось в уменьшении токсических проявлений и улучшении клинического состояния опытных коров.

В первой опытной группе клинические признаки заболевания возникли у двух коров на 6–8-е сут, при этом ослабление симптоматики метаболических нарушений происходило на 12–14-е сут, тогда как во второй группе, где животным назначали препарат-аналог, исчезновение симптомов у заболевших коров (4 головы) происходило на 16–18-е сут. При этом к окончанию эксперимента профилактическая эффективность в первой группе составила 90%, во второй – 80%.

В контрольной группе симптомы заболевания отмечали у 11 коров (55%), животные были угнетены, имели сниженный аппетит, у некоторых коров проявлялись признаки гипотонии (менее трех сокращений рубца за 5 мин), диарея.

Назначение тиононритра-S нормализовало метаболические процессы в печени, что способствовало

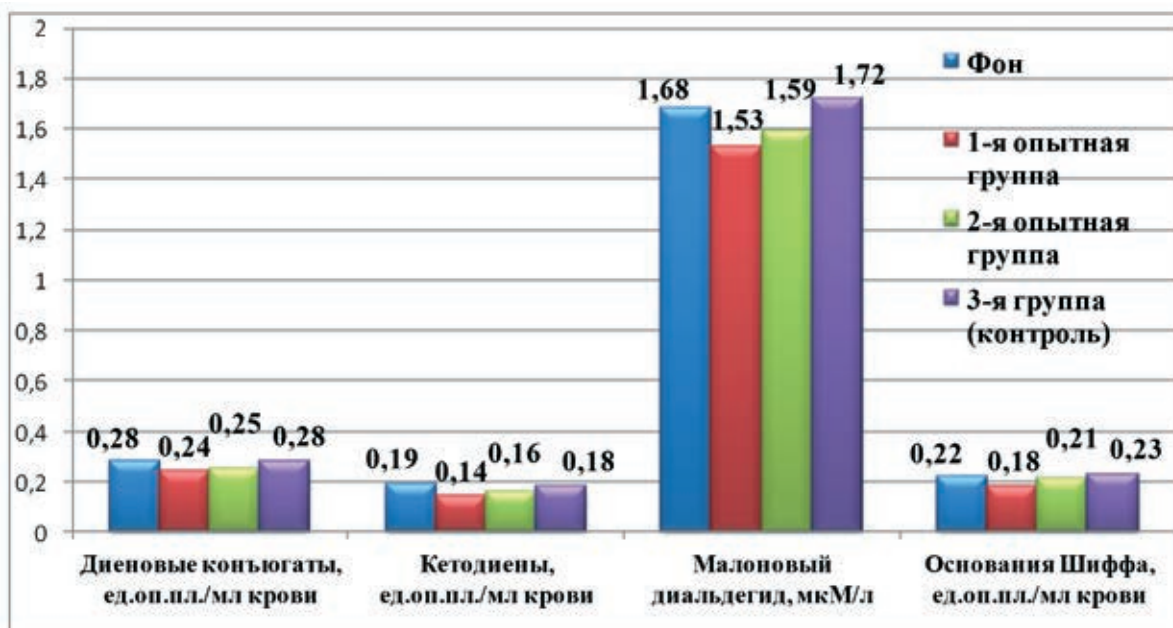
повышению протеинсинтетической функции и перестройке ферментной системы трансаминирования. Повышение уровня общего белка у животных опытной группы по сравнению с фоновыми показателями составило 8,8%, что превышало положительный контроль на 5,1%. Следует отметить, что увеличение данного показателя у коров первой и второй групп происходило в пределах референсных значений, тогда как у коров контрольной группы выявлялась диспротеинемия, проявляемая как гипопропротеинемией (у 40% животных), так и гиперпротеинемией (у 45% животных), что коррелировало с повышением гамма-глобулиновой фракции (на 16,6%) и снижением альбуминов (на 11%).

Развитие мезенхимально-воспалительного синдрома у контрольных животных, приводящего к повышенному синтезу гамма-глобулиновой фракции, подтверждалось положительной тимоловой пробой (проба коллоидустойчивости, позволяющая выявлять изменения сдвигов белкового спектра сыворотки крови). Подобные отклонения в белковом спектре сыворотки крови контрольных коров являются характерными для функциональной недостаточности печени.

Репаративный эффект влияния тиононритра-S на метаболические функции печени проявился более низким уровнем индикаторных ферментов по сравнению с контролем. Уровень аланинаминотрансферазы на конец опыта в первой группе, где коровам назначали тиононритр-S, имел достоверно ($p \leq 0,01$) наиболее низкие цифровые показатели – $31,4 \pm 4,11$ ЕД/л, что было меньше показателей второй группы на 12,3% и контроля в 1,8 раза. Нормализующее действие препарата на ферментообразующую функцию печени у опытных коров также подтверждалось достоверно более низкими показателями аспартатаминотрансферазы – $86,2-101,3$ ЕД/л, что в сравнении с контрольными аналогами было ниже на 36,9%, а в сравнении с отрицательным контролем – в 1,6 раза.

В контрольной группе к концу эксперимента на фоне снижения функциональной активности гепатоцитов пе-

Рис. Динамика продуктов перекисного окисления липидов при применении тиононритра-S и бентонита у коров при профилактике метаболических нарушений функции печени (n = 20)



чени уровень индикаторных ферментов – трансфераз значительно повысился: аланинаминотрансферазы – в 1,9 раза, аспаратаминотрансферазы – на 11,6%.

Положительное влияние тиононрит-5 оказал и на пигментный обмен: при использовании препарата концентрация билирубина была в пределах физиологических границ ($4,28 \pm 0,55$ мкмоль/л), тогда как в контрольной группе выявлялась гипербилирубинемия, в 1,6 раза превышающая верхненормальные значения.

Препарат стабилизировал углеводный и липидный обмены. Повышение уровня глюкозы относительно фона в первой опытной группе составило 26,6%, что превышало показатели позитивного контроля на 11,8%. В отрицательном контроле на фоне интоксикации этот показатель снижался на 6,7%. Профилактическое введение тиононрита-5 и бентонита оптимизировало содержание холестерина и триглицеридов, с приоритетом показателей у коров первой опытной группы, у которых повышение составило 17,1 и 24% соответственно, что было выше аналогичных показателей у животных второй группы на 7,9 и 3,3%.

Исследуемый препарат оказал корректирующее влияние на фосфорно-кальциевый обмен у опытных коров, что проявлялось понижением уровня неорганического фосфора в сыворотке крови на 9,1% и повышением содержания общего кальция на 23,8%, тогда как у контрольных коров фосфорно-кальциевое соотношение было ниже видовой нормы.

Снижение функциональной активности гепатоцитов печени контрольных животных привело и к ослаблению мочевинообразовательной функции: уровень мочевины на конец опыта у них был ниже фоновых показателей в 1,5 раза. В опытной группе и группе позитивного контроля уровень мочевины варьировал в физиологических пределах (5,0–5,4 ммоль/л).

Улучшение биохимических показателей в опытной группе коррелировало со снижением уровня МСМ – индикаторов степени тяжести патологического процесса, служащих прогностическим критерием нарушения обменных процессов, которое на длине волны $\lambda = 254$ нм составило 8,3% и на длине волны $\lambda = 280$ нм – 10%, что было ниже соответствующих показателей в группе, где животным назначали препарат-аналог, на 12 и 14,3%. В контрольной группе развитие патологических сдвигов, помимо нарушения биохимического статуса, подтверждалось повышением концентрации МСМ (на $\lambda = 254$ нм – на 20,8%, на $\lambda = 280$ нм – на 25%).

Наиболее выраженное позитивное влияние на показатели, характеризующие интенсивность перекисно-

го окисления липидов, отмечали у коров при введении тиононрита-5. Оно проявлялось в снижении концентрации всех продуктов липопероксидации (см. рисунок).

Так, в сравнении с фоновыми показателями уровень ДК был ниже на 14,3, КД – на 26,3, МДА – на 8,9 и ОШ – на 18,2%, по отношению к контролю – ниже на 14,3, 22,2, 11,0 и 21,7% соответственно. В группе, где животным назначали бентонит, снижение уровня продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в динамике было менее выраженным: ДК – на 14,3, КД – на 15,8, МДА – на 5,4 и ОШ – на 4,5%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что применение тиононрита-5 при профилактике метаболических нарушений функции печени у коров способствует улучшению клинического статуса, нормализации биохимической картины крови и восстановлению функционального состояния печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гликемия как основной маркер метаболических нарушений у коров в переходный период / А. Г. Коцаев, В. В. Усенко, А. В. Лихоман [и др.] // Зоотехния. – 2016. – № 1. – С. 19–20.
2. Доклиническое изучение гепатозащитного средства / М. П. Семенов, Е. В. Кузьмина, Е. В. Тяпкина [и др.] // Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 141–143.
3. Душкин Е. В. Состояние печени коров по фазам репродуктивного цикла и во время ее жировой инфильтрации в период раздоя при разных уровнях кормления // Ветеринария Кубани. – 2006. – № 6. – С. 21.
4. Коцаев А. Г., Усенко В. В., Лихоман А. В. Здоровье животных – основной фактор эффективного животноводства // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – 2014. – № 99. – С. 201–210.
5. Применение биологически активных веществ для нормализации обменных процессов у животных / Е. В. Кузьмина, М. П. Семенов, Е. А. Старикова, Е. В. Тяпкина // Вестник Алтайского ГАУ. – 2013. – № 11 (109). – С. 80–83.
6. Рядчиков В. Г., Подворок Н. И., Потехин С. А. Питание высокопродуктивных коров. – Краснодар: КубГАУ, 2002. – С. 11–56.
7. Этиопатогенез и особенности гепатотропной терапии коров при гепатозах / М. П. Семенов, Е. В. Кузьмина, Ф. Д. Онищук, Е. В. Тяпкина // Ветеринария. – 2016. – № 4. – С. 42–46.



УДК 619:578.245:615.371:57.082.26

ВЛИЯНИЕ ПОЛУДАНА НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСОВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА, ТРАНСМИССИВНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА И АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Д. В. Шарыпова¹, И. Ю. Жуков², Али Мазлум³, Н. Н. Власова⁴, О. С. Пузанкова⁵, В. Л. Гаврилова⁶, А. С. Иголкин⁷

¹ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sharipova@arriah.ru

² Ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: Zhukov@arriah.ru

³ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: ali.mazloun6@gmail.com

⁴ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁵ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: puzankova@arriah.ru

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

⁷ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время актуальным вопросом в профилактике и лечении вирусных инфекций является изучение действия на организм человека и животных индукторов синтеза интерферона – веществ природного или синтетического происхождения, стимулирующих продукцию собственного интерферона. Одним из синтетических индукторов интерферона является полудан. Он предназначен для стимуляции клеточного иммунитета, который способен предотвращать заражение и развитие заболевания, а также обладает противовирусным и иммуномодулирующим действием. В клетках и тканях организма полудан в основном стимулирует выработку α-интерферона и в меньшей степени – β- и γ-интерферона, образование которых препятствует размножению вируса в клетке. Представлены результаты влияния полудана на репродукцию ряда вирусов свиней в первичных и перевиваемых культурах клеток путем индукции

синтеза интерферона и других цитокинов, понижающих уровень инфицирования клеток. В результате проведенных исследований выявили взаимосвязь внесения индуктора интерферона и изменения уровня репродукции вирусов репродуктивно-респираторного синдрома свиней, трансмиссивного гастроэнтерита свиней и африканской чумы свиней. Также установлен высокий уровень интерферон-генной активности полудана в первичных культурах клеток тестикул и селезенки свиней по сравнению с перевиваемыми линиями клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и почки макаки-резуса (MARC-145). Интерферон-генная способность полудана была умеренной для клеток MARC-145 и не установлена для клеток СПЭВ.

Ключевые слова: репродуктивно-респираторный синдром свиней, трансмиссивный гастроэнтерит свиней, африканская чума свиней, полудан, интерферон.

UDC 619:578.245:615.371:57.082.26

POLUDANUM'S INFLUENCE ON REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME, TRANSMISSIBLE GASTROENTERITIS AND AFRICAN SWINE FEVER VIRUSES IN PRIMARY AND CONTINUOUS CELL CULTURES

D. V. Sharypova¹, I. Yu. Zhukov², Ali Mazlum³, N. N. Vlasova⁴, O. S. Puzankova⁵, V. L. Gavrilova⁶, A. S. Igolkin⁷

¹ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: sharipova@arriah.ru

² Leading Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: Zhukov@arriah.ru

³ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: ali.mazloun6@gmail.com

⁴ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁵ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: puzankova@arriah.ru

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

⁷ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

SUMMARY

Today studies of the influence of interferon synthesis inducer on human and animal body is a topical issue. Interferon synthesis inducers are substances of natural or artificial origin stimulating production of body's own interferon. One of the synthetic inducers of interferon is Poludanum. It is used for stimulation of cell immunity which is capable of preventing infection and disease development and has antiviral and immunomodulatory effect. Poludanum mainly stimulates induction of α-interferon and, to a lesser extent, β- and γ-interferon in cells and tissues which prevent virus reproduction in a cell. The paper presents results of poludanum's influence on reproduction of some porcine viruses in primary and continuous cell cultures by induction of inter-

feron synthesis and other cytokines lowering the level of cell infection. As a result of performed tests it was found out that there is a link between introduction of interferon inducer and change in the PRRS, TGE, ASF virus reproduction. There was detected a high level of Poludanum's interferon inducing activity in pig testicular primary cell cultures and spleen compared to the continuous pig embryo kidney (SPEV) and rhesus monkey kidney (MARC-145) cell lines. Poludanum's interferon inducing activity was moderate for MARC-145 cells and it was not determined for SPEV.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; transmissible gastroenteritis in pigs, African swine fever, poludanum, interferon.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внимание многих ученых приковано к исследованию факторов неспецифической защиты организма, в частности к роли интерферонов и иммуномодуляторов в профилактике и лечении различных вирусных инфекций [5].

Противоинфекционную защиту обеспечивают такие факторы врожденного иммунитета, как α -, β -, γ -интерфероны, натуральные киллеры (NK), системы пропердина, комплемента, лизоцим, фагоцитоз и др., а также специфические факторы гуморального (В-клетки секретируют соответствующие иммуноглобулины) и клеточного иммунитета (CD4, CD8, Т-клетки) [8, 9].

Интерфероны (ИФН) – это семейство белков, относящихся к цитокинам – медиаторам иммунитета, которые проявляют противовирусную активность, участвуют в антимикробной и противоопухолевой защите, а также обладают антипролиферативными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и радиопротекторными свойствами [2, 8, 9].

ИФН начинают вырабатываться внутри клеток в ответ на внедрение в организм инфекционного вируса. Они многофункциональны, так как препятствуют проникновению инфекционных агентов внутрь чувствительных клеток; ингибируют синтез белка в клетке и, следовательно, замедляют размножение вируса; являются пусковым механизмом цитотоксического ответа и адаптивного иммунитета, что в конечном итоге влияет на течение и исход болезни [8, 9].

Использование экзогенных ИФН с целью успешного лечения острых и хронических заболеваний или для профилактики заражения может привести к побочным эффектам, например аллергическим реакциям. Поэтому альтернативой является использование индукторов эндогенного интерферона – высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, способных в той или иной степени стимулировать синтез собственных ИФН [8, 9].

Данные иммуномодуляторы эффективно индуцируют выработку ИФН, как правило, не вызывают аллергических реакций, безопасны и нетоксичны, поскольку представляют собой природные или синтетические препараты нуклеиновых кислот (полудан, амплиген, полигуацил, ларифан, ридостин) или полифенолы природного происхождения, в том числе флуореноны и акриданоны – производные карбоновых кислот [7, 8].

Полигуацил, амплиген, ридостин – это природные и синтетические препараты нуклеиновых кислот (дс-РНК), а полудан представляет собой биосинтетический полирибонуклеотидный комплекс, состоящий из полирибоадениловой и полирибоуридиловой кислот [7].

Индукторы, относящиеся к разным классам соединений, различаются по диапазону доз, стимулирующих образование ИФН. Из известных сегодня индукторов наиболее активную продукцию ИФН вызывает метилглюкамина акридоацетат, индуцирующий в организме животных до 1 млн ЕД/мл, а в культурах клеток лимфоцитов человека – до 1280–2560 ЕД/мл ИФН. Метилглюкамина акридоацетат уже в дозе 4–14 мг/кг вызывает продукцию α -, β -, γ -, λ -ИФН начиная с 2 до 72 ч от момента введения, таким образом обеспечивая противовирусную и иммуномодулирующую активность [1, 2, 5, 8].

Одним из широкодоступных индукторов ИФН является полудан, который обладает противовирусным и иммуномодулирующим действием. В клетках и тканях организма он в основном стимулирует выработку α -ИФН

и в меньшей степени – β - и γ -ИФН, образование которых препятствует размножению вируса в клетке [6, 11, 16].

В свою очередь, для определения эффективности индукторов ИФН *in vitro* используют различные культуры клеток, такие как первичная культура клеток лимфоцитов человека, а также перевиваемая ИФН-чувствительная линия клеток BSC-1. Тем не менее подбор первичных и перевиваемых культур клеток животных для изучения противовирусной активности различных иммуномодуляторов также является актуальной проблемой и для ветеринарии.

Целью данной работы являлось изучение противовирусной активности полудана *in vitro* с использованием различных вирусов болезней свиней и соответствующих культур клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы вирусы репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCS), трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГЭС) и африканской чумы свиней (АЧС).

Использовали штаммы вируса PPCS американского («Иркутский-2007-В» и NVSL – слабовирулентные, «БД» – авирулентный вакцинный) и европейского генотипа («КПР» – авирулентный вакцинный, «Итальянский-2165» – слабовирулентный); вируса ТГЭС («Ленинградский» – слабовирулентный вакцинный, «Ильиногорский» и «Краснодонский» – авирулентные вакцинные); изолят вируса АЧС «Лазаревское 01/14», выделенный из пробы селезенки домашней свиньи (Тульская обл., Щекинский р-н, ООО ПХ «Лазаревское»), и штамм вируса АЧС 8-№ 2 «Одинцово 02/14», полученный из пробы селезенки отстрелянного кабана (Московская обл., Одинцовский р-н, Таракановское лесничество).

С целью изучения влияния индукторов ИФН использовали лиофильно высушенный препарат полудана (ООО «Лэнс-Фарм», дочерняя компания ОАО «Верофарм», г. Москва), 100 ЕД, который растворяли в питательной среде Игла и добавляли в культуральные флаконы с субконфлюэнтным монослоем культуры клеток в дозах 25–100 ЕД за 24 ч до заражения вирусом.

Использовали перевиваемые культуры клеток (КК) СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи) и MARC-145 (клетки почки макаки-резуса), которые получали из сектора культур клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Первичные КК тестикул свиней (ТС) и селезенки свиньи (СС) получали в референтной лаборатории по африканской чуме свиней путем трипсинизации тканей с использованием питательной среды Игла, в которую добавляли 20% фетальной сыворотки КРС (PAN-Biotech, Германия) и противомикробные средства широкого спектра действия [2].

Суспензию КК СПЭВ, MARC-145 и ТС в посевной концентрации 500, 150–200 и 250 тыс. кл/см³ соответственно использовали для посева в культуральные флаконы (матрасы) площадью 25 см² или лунки 96-луночных культуральных микропланшетов. Подсчет клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Invitrogen™, Корея). Инкубировали планшеты с КК в СО₂-инкубаторе с содержанием 5% СО₂.

Опыты с использованием полудана проводили по следующей схеме: из матрасов с монослоем удаляли культуральную среду, в одну группу матрасов на монослой клеток вносили по 0,5 см³ раствора полу-

дана в дозе 25–100 ЕД, в другую – такое же количество питательной среды, по 2 матраса оставляли в качестве контроля культуры клеток. Матрасы с полуданом и без него инкубировали в термостате в течение 1 ч при температуре (37 ± 0,5) °С. Затем вносили по 9 см³ питательной среды в каждый матрас. Спустя 24 ч в каждый из матрасов вносили по 1 см³ препарата вируса в разведениях 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, заранее приготовленных в пенициллиновых флаконах. Все пробы исследовали с помощью светового инвертированного микроскопа «Биолам П-1» (ОАО «ЛОМО»).

Через 72–144 ч после внесения вируса, когда наблюдалось существенное по степени выраженности цитопатическое действие (ЦПД), матрасы с полуданом и без полудана помещали в морозильную камеру (–70 °С) на 1–2 ч. Затем вирусосодержащую жидкость «замораживали – оттаивали» и отбирали пробы для определения инфекционной активности вируса.

Титрование проводили в 96-луночных культуральных микропланшетах с соответствующей КК. Инфекционный титр вируса рассчитывали по методу Кербера (1931) в модификации И. П. Ашмарина (1959, 1962) и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичный анализ интерферогенной активности полудана проводили с использованием КК MARC-145, инфицированной вирусом РРСС. Для штамма «Иркутский-2007-В» разведение вируса составляло 10⁻⁶, т. е. ~3 ТЦД₅₀/см³, для всех остальных используемых в работе штаммов – 10⁻⁵, т. е. 10–17 ТЦД₅₀/см³. Через 24–48 ч после инокуляции вируса во всех матрасах с полуданом и без него наблюдали незначительные изменения в монослое – 5–10% округлившихся клеток. Постепенно монослой деадегезировался, отдельные клетки слущивались в питательную среду, а уже через 120 ч поражение охватывало более 85% монослоя, причем в контроле КК монослой оставался неповрежденным.

ЦПД штамма «Иркутский-2007-В» вируса РРСС более четко проявилось в матрасах с культурой клеток, обработанной полуданом в дозе 50 ЕД, по сравнению с культурой клеток без обработки полуданом (табл. 1).

Показано, что инокуляция полудана в культуру клеток MARC-145 способствовала снижению титра штамма «Иркутский-2007-В» вируса РРСС на 0,75 Ig ТЦД₅₀/см³, а штамма NVSL – на 1,50 Ig ТЦД₅₀/см³. Следовательно, для вируса РРСС под влиянием полудана отмечалось снижение инфекционной активности в среднем на 1,25 Ig ТЦД₅₀/см³. Однако внесение полудана не оказало существенного влияния на репродукцию штамма «БД» вируса РРСС.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявили снижение титров вируса РРСС в культуре клеток MARC-145 под влиянием полудана, так как данный препарат активизировал выработку ИФН в клетках MARC-145.

Анализ влияния индукции ИФН на репродукцию вируса ТГЭС (штаммы «Ленинградский», «Ильиногорский» и «Краснодонский»), адаптированного к росту в культуре клеток СПЭВ, проводили с использованием указанной КК.

В КК СПЭВ ЦПД вируса ТГЭС проявлялось в виде округления клеток и их дегенерации. Признаками дегенерации клеток являлись их сморщивание, исчезно-

Таблица 1
Титры инфекционной активности вируса РРСС в культуре клеток MARC-145 с добавлением полудана и без полудана (n = 3)

| Штамм вируса | Генотип вируса | Титр вируса (lg ± 0,25 lg ТЦД ₅₀ /см ³) | |
|--------------------|----------------|--|--------------|
| | | с полуданом | без полудана |
| «Иркутский-2007-В» | Американский | 5,75 | 6,50 |
| «БД» | | 6,25 | 6,50 |
| NVSL | | 5,00 | 6,50 |
| «Итальянский-2165» | Европейский | 4,50 | 4,75 |
| «КПР» | | 5,75 | 6,50 |

Таблица 2
Результаты титрования вируса ТГЭС в культуре клеток СПЭВ с полуданом и без полудана (n = 3)

| Штамм вируса | Титр вируса (lg ± 0,25 lg ТЦД ₅₀ /см ³) | |
|-----------------|--|--------------|
| | с полуданом | без полудана |
| «Ленинградский» | 7,00 | 7,00 |
| «Краснодонский» | 7,75 | 7,75 |
| «Ильиногорский» | 4,75 | 4,75 |

вление контура ядра и наступление гибели клеток в течение 24–36 ч после инокуляции вируса.

В результате экспериментов установлено, что при добавлении полудана в дозе 50 ЕД и без него не наблюдались различия в проявлении ЦПД вируса ТГЭС при инфицировании клеток в дозе 10 ТЦД₅₀/см³ (разведение 10⁻⁶) при 144-часовой экспозиции вируса (табл. 2).

Вирус ТГЭС всех трех исследуемых штаммов при добавлении полудана репродуцировался так же, как при культивировании данного вируса без использования полудана.

С целью определения возможной интерферогенной дозы полудана для клеток СПЭВ провели серию опытов по анализу изменений вирусной активности при внесении разных количеств полудана (табл. 3).

Сделали вывод, что внесение полудана в дозах от 25 до 100 ЕД не вызывает существенных изменений в инфекционной активности вируса ТГЭС. Таким образом, полудан не обладает интерферогенной способностью для клеток СПЭВ, и использование этой линии

Таблица 3
Сравнительные данные титров инфекционной активности вируса ТГЭС, штамм «Ленинградский», в культуре клеток СПЭВ с разными дозами полудана и без полудана (n = 3)

| Разведение вируса | Титр вируса (lg ± 0,25 lg ТЦД ₅₀ /см ³) | | | |
|----------------------------|--|-------|--------|--------------|
| | с полуданом | | | без полудана |
| | 25 ЕД | 50 ЕД | 100 ЕД | |
| 10 ⁻⁵ (100 доз) | 7,75 | 7,75 | 7,75 | 7,50 |
| 10 ⁻⁶ (10 доз) | 7,50 | 7,50 | 7,50 | 7,75 |

Таблица 4
Титры инфекционной активности вируса ТГЭС, штамм «Ленинградский», в культуре клеток ТС с полуданом и без полудана ($n = 3$)

| Доза вируса, ТЦД ₅₀ /см ³ | Титр вируса ($Ig \pm 0,25 Ig$ ТЦД ₅₀ /см ³) | | | |
|---|---|--------------|------------------------------|--------------|
| | 250 тыс. кл./см ³ | | 500 тыс. кл./см ³ | |
| | с полуданом | без полудана | с полуданом | без полудана |
| 100 | 5,00 | 7,25 | 4,00 | 7,37 |
| 10 | 4,75 | 7,25 | 3,37 | 7,37 |
| 1 | 2,50 | 7,25 | 2,00 | 7,37 |

Таблица 5
Результаты титрования вируса АЧС в культуре клеток СС с полуданом и без полудана ($n = 5$)

| Заражающая доза, ГАД ₅₀ /см ³ | Титр вируса ($Ig \pm 0,25 Ig$ ГАД ₅₀ /см ³) | | | |
|---|---|--------------|------------------------|--------------|
| | «Лазаревское 01/14» | | 8-№ 2 «Одинцово 02/14» | |
| | с полуданом | без полудана | с полуданом | без полудана |
| 1000 | 7,00 | 7,25 | 6,50 | 7,00 |
| 100 | 6,75 | 7,25 | 5,25 | 7,00 |
| 10 | 6,50 | 7,25 | 4,00 | 7,00 |

клеток для изучения влияния ИФН на репродукцию вируса нецелесообразно.

На следующем этапе изучали интерферогенную способность полудана в первичных КК ТС с использованием вируса ТГЭС, штамм «Ленинградский».

С этой целью приготовили разведения от 10^{-1} до 10^{-7} вируса ТГЭС. Последними разведениями (с 10^{-5} до 10^{-7}) заражали матрасы с монослоем ТС, обработанные полуданом и без обработки. В течение первых 24 ч репродукции вируса ТГЭС в монослое ТС наблюдали появление округлых клеток, увеличенных в размере. Через 48 ч вирус ТГЭС начал более активно разрушать монослой: на 35–45% – с полуданом, на 75–80% – без полудана.

В период максимального различия ЦПД вируса в матрасах (через 48 ч после инокуляции) пробы были заморожены, и в дальнейшем в планшетах с первоначальной посадочной концентрацией клеток 250 и 500 тыс. кл./см³ был определен титр накопившегося вируса в клетках ТС (табл. 4). Доза полудана составила 50 ЕД.

Результаты показали различия в титрах в сто и более раз (от 2,25 до 5,37 Ig ТЦД₅₀/см³). Это свидетельствует о том, что полудан значительно увеличивает выработку ИФН в первичной КК ТС.

Поскольку для вируса АЧС установлено, что ИФН оказывают существенное воздействие на его репликацию в зависимости от вирулентности изолята, особый интерес представлял анализ чувствительности к ИФН российских изолятов [15]. Для этого были выбраны два варианта вируса с различающейся степенью вирулентности для свиней: изолят «Лазаревское 01/14» обладал 100%-й летальностью, а летальность штамма 8-№ 2 «Одинцово 02/14» была не менее 80%. Доза полудана для клеток СС составила 50 ЕД.

Результаты анализа (табл. 5) показали, что снижение уровня накопления вируса для изолята «Лазаревское 01/14» было достоверным, но незначительным и не превышало значения 1,00 Ig ГАД₅₀/см³. Для штамма 8-№ 2 «Одинцово 02/14» разница в титрах вируса в пробах с полуданом и без него варьировала в более широких пределах: от 0,50 до 3,00 Ig ГАД₅₀/см³.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявили, что полудан обладает высокой интерферогенной активностью для первичных КК ТС и СС, которые способны продуцировать ИФН в большей степени, чем перевиваемые КК. Это выражается в ингибировании развития ЦПД вирусов, снижении уровня их накопления.

ОБСУЖДЕНИЕ

По литературным данным известно, что клетки первичной культуры в большей степени, чем перевиваемые, секретируют ИФН типа I (включающий α - и β -ИФН), который защищает соседние клетки от инфицирования различными вирусами, например РРСС, ТГЭС (табл. 6), и тормозит их репликацию [12, 17, 18]. В свою очередь, некоторые вирусы способны с помощью определенных неструктурных белков подавлять синтез ИФН в клетках, что облегчает их репродукцию в определенных КК. Так, например, неструктурный белок 2 вируса РРСС обладает не только деубиквитинилирующей активностью, но и является антагонистом ИФН [18].

Для вируса АЧС было установлено наличие генов, продукты экспрессии которых ингибируют выработку ИФН в моноцитах и макрофагах свиньи. Причем для вирулентных изолятов было доказано, что при их репродукции наблюдается существенное снижение уровня выработки ИФН в инфицированных клетках [13].

По данным А. L. Reis и соавт., удаление генов мультигенных семейств MGF 360 и MGF 505, ответственных за синтез ингибиторов ИФН, из генома вирулентного вируса АЧС снижает его летальность для домашних свиней [14].

В проведенных экспериментах наблюдали существенную разницу в чувствительности к воздействию ИФН у изолята «Лазаревское 01/14» и штамма 8-№ 2 «Одинцово 02/14» вируса АЧС. Этот факт полностью согласуется с выводами А. L. Reis и соавт., поскольку в геноме штамма 8-№ 2 «Одинцово 02/14» выявлена делеция в гене 4R мультигенного семейства MGF 505, отсутствующая в геноме изолята «Лазаревское 01/14» [3].

Следовательно, в результате работы определены основные параметры влияния интерферогенной активности полудана при изучении особенностей репродукции вирусов РРСС, ТГЭС и АЧС. Обобщенные результаты представлены в таблице 6.

Таким образом, принимая во внимание важную роль интерферона при развитии защитного иммунитета *in vivo*, важно научиться определять *in vitro* способность различных штаммов испытываемых вирусов стимулировать и/или ингибировать продукцию интерферона в клетках; подбирать наиболее эффективные индукторы интерферона, которые можно будет использовать для профилактики и лечения различных заболеваний животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы для перевиваемой культуры клеток MARC-145 была установлена

умеренная интерферогенная активность полудана, которая проявилась в снижении титра вируса РРСС на 0,25–1,50 Ig ТЦД₅₀/см³ в зависимости от штамма. Эти результаты согласуются с данными, полученными L. C. Miller и соавт. [17].

В то же время при использовании перевиваемой линии клеток СПЭВ не удалось выявить влияния полудана на репродукцию вируса ТГЭС, что может быть вызвано либо отсутствием интерферогенного воздействия полудана на данные клетки, либо тем, что клетки СПЭВ не обладают способностью эффективно продуцировать интерферон, поэтому они не могут быть использованы для изучения интерферогенной активности полудана.

Для клеток ТС отмечалось снижение титров вируса ТГЭС, штамм «Ленинградский», в 2 раза и более (от 2,25 до 5,37 Ig ТЦД₅₀/см³) в культуре клеток, предварительно обработанной полуданом, по сравнению с титрами накопления данного вируса в культуре, не обработанной полуданом.

При анализе интерферогенной активности полудана и его воздействия на репродукцию вируса АЧС в первичной культуре клеток СС установлено снижение титра накопления для изолята «Лазаревское 01/14» на 0,25–0,75 Ig ГАДЕ₅₀/см³, а для штамма 8-№ 2 «Одиноково 02/14» – на 0,50–3,00 Ig ГАДЕ₅₀/см³, что связано с особенностями структуры его генома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андронати С. А., Литвинова Л. А., Головенко Н. Я. Пероральный индуктор эндогенного интерферона «Амиксин» и его аналоги // Журн. АМН Украины. – 1999. – Т. 5, № 1. – С. 53–66.
2. Изучение репродукции вируса африканской чумы свиней на первичной культуре клеток костного мозга свиней до и после криоконсервирования / И. Ю. Жуков, И. В. Шевченко, Н. Н. Власова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1. – С. 7–15.
3. Исследование молекулярно-генетических особенностей изменчивости вируса АЧС, циркулирующего на территории РФ / Н. Н. Власова, А. А. Елсукова, А. А. Варенцова [и др.] // Актуальные проблемы в промышленном свиноводстве: 6-й Междунар. вет. конгр., Сочи, 12–15 апр. – Сочи, 2016. – С. 11.
4. Кузнецов В. П. Интерфероны в каскаде цитокинов: исторический и современный аспекты // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т. 43, № 5. – С. 28–40.
5. Медведева М. В., Беляк А. С. Воздействие препарата полудан на иммунологические и биохимические показатели крови животных с экспериментальным конъюнктивитом в магнитном поле повышенной напряженности // Человек и его здоровье. – 2015. – № 4. – С. 104–107. – URL: <http://www.kursk-vestnik.ru/jour/article/view/82/83> (дата обращения: 24.04.17).
6. Митягина О. Н., Павлюк А. С. Влияние иммуномодулятора «полудана» на клеточную регенерацию и состояние апоптоза в эксперименте // Тезисы 1-го российского симпозиума по рефракционной хирургии. – М., 1999. – С. 66.
7. Никитин Е. В., Чабан Т. В., Лапай В. С. Использование индуктора интерферона амиксин в комплексной терапии острых и хронических вирусных гепатитов. – Одесса, 2000. – 16 с.
8. Полудан. – URL: http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_6054.htm (дата обращения: 24.04.17).
9. Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней / Ф. И. Ершов [и др.] // Вестник РАМН. – 2013. – Т. 68, № 10. – С. 46–52.

Таблица 6
Влияние полудана на репродукцию испытуемых вирусов

| Вирус | Штамм | Характеристика штамма | Культура клеток | Эффект от введения полудана |
|-------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------------|
| РРСС | «Иркутский-2007-В» | Слабовирулентный | MARC-145 | + |
| | «БД» | Авирулентный | MARC-145 | ± |
| | NVSL | Слабовирулентный | MARC-145 | + |
| | «Итальянский-2165» | Слабовирулентный | MARC-145 | ± |
| | «КПР» | Авирулентный | MARC-145 | + |
| ТГЭС | «Ленинградский» | Слабовирулентный | ТС | + |
| | «Ленинградский» | Слабовирулентный | СПЭВ | – |
| | «Ильиногорский» | Авирулентный | СПЭВ | – |
| | «Краснодонский» | Авирулентный | СПЭВ | – |
| АЧС | «Лазаревское 01/14» | Летальность 100% | СС | ± |
| | 8-№ 2 «Одиноково 02/14» | Летальность ≥ 80% | СС | + |

«+» – положительный результат; «±» – сомнительный результат; «–» – отрицательный результат.

10. Романцов М. Г., Ершов Ф. И., Коваленко А. Л. Противовирусные препараты для лечения ОРВИ и гриппа у детей (клинический обзор) // Фундамент. исследования. – 2010. – № 9. – С. 76–87.

11. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Современные иммуномодуляторы. Классификация. Механизм действия. – М.: Фармарус принт, 2005. – 27 с.

12. Charley B., Lavenant L. Characterization of blood mononuclear cells producing IFN alpha following induction by coronavirus-infected cells (porcine transmissible gastroenteritis virus) // Res. Immunol. – 1990. – Vol. 141, No. 2. – P. 141–151.

13. Costa E. Viral modulation of interferon (IFN) responses to African swine fever virus (ASFV): Dissertação. – Departamento de Biologia Animal, Lisboa, 2011. – 61 p.

14. Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response / A. L. Reis, C. C. Abrams, L. C. Goatley [et al.] // Vaccine. – 2016. – Vol. 34, No. 39. – P. 4698–4705.

15. Esparza I., González J. C., Viñuela E. Effect of interferon-α, interferon-γ and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages // J. Gen. Virol. – 1988. – Vol. 69. – P. 2973–2980.

16. Immunomodulators in the prevention of acute respiratory viral infections / T. A. Semenenko [et al.] // Rus. J. Immunol. – 2002. – Vol. 7, No. 2. – С. 105–114.

17. Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells / L. C. Miller, W. W. Laegreid, J. L. Bono [et al.] // Arch. Virol. – 2004. – Vol. 149, No. 12. – P. 2453–2463.

18. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions / Z. Sun, Z. Chen, S. R. Lawson, Y. Fang // J. Virol. – 2010. – Vol. 84, No. 15. – P. 7832–7846.

УДК 619:616.98:578.842.1:578.833.31:616-076

АНАЛИЗ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО РЯДУ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2011–2017 гг.

А. А. Шевцов¹, О. Н. Петрова², С. Г. Ремыга³, А. С. Першин⁴, К. Н. Груздев⁵, А. С. Иголкин⁶

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

² Заведующий сектором, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: petrova@arriah.ru

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

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

⁵ Главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: gruzdev@arriah.ru

⁶ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Ретроспективный анализ лабораторной диагностики, проводимой в России по опасным вирусным болезням свиней, показал, что за последние семь лет (период реализации распоряжений Россельхознадзора по выполнению планов государственного мониторинга) отмечается увеличение объема осуществляемых исследований. Однако не всегда можно однозначно истолковать получаемые результаты тестирований, что требует усовершенствования диагностической практики с установлением правил проведения пробоотбора, лабораторных исследований, представления полученных результатов. Так, осуществляемые выборочные исследования должны быть представительны в отношении обследуемых субпопуляций, соотноситься с превалентностью надзираемой инфекции, отвечать требуемой достоверности. Также требуется установить методы первичного и подтверждающего тестирования, упорядочить использование тест-систем (обязательно валидированных) в пользу наиболее эффективных и недорогих. Соответствующим образом спланированные и реализуемые мероприятия надзора (в том числе государственный мониторинг) позволят минимизировать финансовые затраты и одновременно повысить их эффективность.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, африканская чума свиней, классическая чума свиней, болезнь Ауески, репродуктивно-респираторный синдром свиней, надзор, мониторинг.

UDC 619:616.98:578.842.1:578.833.31:616-076

ANALYSIS OF LABORATORY TESTS FOR SEVERAL VIRAL SWINE DISEASES IN RUSSIA IN 2011–2017

A. A. Shevtsov¹, O. N. Petrova², S. G. Remyga³, A. S. Pershin⁴, K. N. Gruzdev⁵, A. S. Igolkin⁶

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

² Head of Sector, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: petrova@arriah.ru

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

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

⁵ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: gruzdev@arriah.ru

⁶ Head of the Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

ABSTRACT

Retrospective analysis of laboratory diagnostics carried out in Russia for dangerous viral swine diseases demonstrated that during the last seven years (the period when the Rosselkhoznadzor orders to implement National Monitoring Plans were executed) the amount of performed tests had increased. But it is not always possible to read the test results unambiguously and that requires the improvement of diagnostic practices supported by established rules of sampling, laboratory tests and obtained result submission. It means random tests shall be representative for tested populations, correlate with the prevalence of concerned infection and meet the required certainty. It is also needed to establish the techniques of primary and confirmation tests, regulate the use of test kits (validated) preferring the use of the most effective and cheapest. Appropriately planned and implemented surveillance activities (including national monitoring) will contribute to minimization of financial expenses and improve their effectiveness at the same time.

Key words: laboratory diagnosis, African swine fever, classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, surveillance, monitoring.

ВВЕДЕНИЕ

Российская Федерация (РФ) остается неблагополучной по ряду опасных вирусных болезней свиней [6, 12]. Предотвращение распространения инфекций и оздоровление территорий страны от заболеваний напрямую зависит от эффективности реализуемой системы надзора. В отсутствие официальных надзорных программ действующая в РФ структура сбора и анализа эпизоотической информации не может отвечать ряду насущных международных рекомендаций. Это, вместе со сложной эпизоотической ситуацией, требует совершенствования системы надзора, в частности регламентации порядка проведения, сбора и анализа результатов диагностических мероприятий.

Современный потенциал лабораторных исследований на африканскую и классическую чуму свиней (АЧС, КЧС), болезнь Ауески (БА), репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) позволяет достаточно быстро и надежно подтверждать диагноз на данные инфекции [2, 12]. В то же время имеющийся широкий ассортимент диагностических тестов диктует необходимость выбора тех из них, которые в первую очередь отвечают назначению исследований.

При этом основными целями системы надзора являются:

- доказательство отсутствия или выявления присутствия болезни/инфекции;
- установление тенденций развития болезни в восприимчивых популяциях;
- раннее выявление экзотических или эмерджентных болезней [11, 12].

Реализуемые сейчас в РФ меры профилактики и борьбы с КЧС, БА не позволяют претендовать на получение страной или ее отдельными субъектами международного статуса благополучия. Для этого необходимо, чтобы у домашних и содержащихся в неволе диких свиней последние два года (для БА) или один год (для КЧС) вакцинация не проводилась либо имелась возможность дифференцировать привитых свиней от зараженных (стратегия DIVA – Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) [12].

Для обоснованного решения об изменении стратегии борьбы (например, для отказа от вакцинации), так же как и для изменения статуса благополучия терри-

торий страны, необходимы точные данные о распространении заразных болезней животных (в том числе о скрытом носительстве). Они должны подтверждаться не только отсутствием заявленных вспышек болезни, но и результатами представительных, достоверных лабораторных исследований. В отсутствие таких требований на практике могут запаздывать с постановкой диагноза, преждевременно объявлять оздоровленными отдельные территории страны.

Представленные в данной работе результаты анализа отчетности по проведению лабораторных исследований по АЧС, КЧС, БА и РРСС на территории России, наряду с отечественными методологиями по усовершенствованию диагностических мероприятий [4, 5] и международными рекомендациями [12], будут полезны при разработке нормативно-правовых актов, касающихся организации системы надзора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

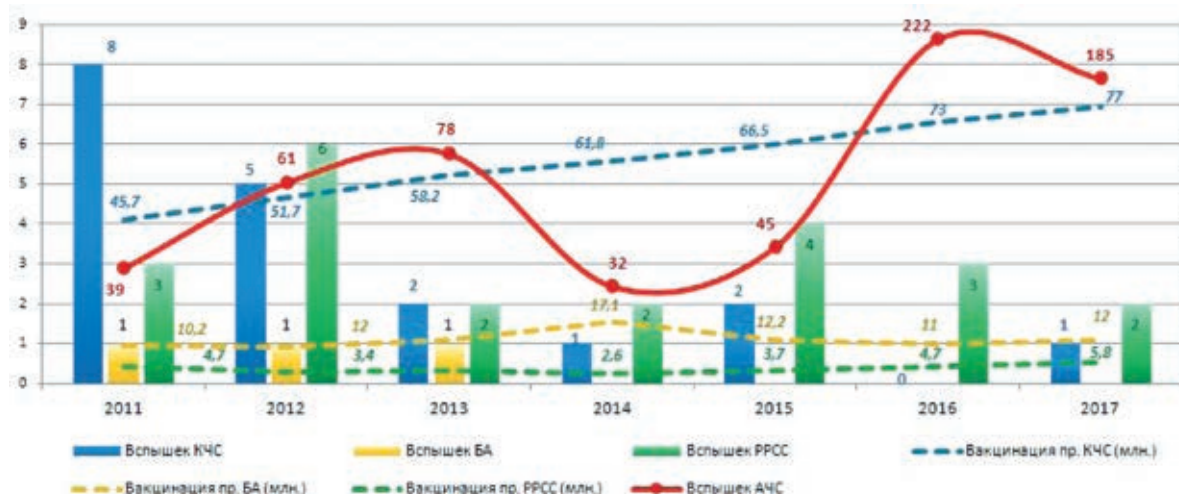
Для анализа использовались данные по проведению лабораторных исследований, представляемые в электронную государственную информационную систему (ГИС) «Ветис» [1], сведения ветеринарной отчетности ФГБУ «Центр ветеринарии» (ФГБУ «ЦВ») [6], данные Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В России эпизоотическая ситуация по АЧС ухудшается. Инфекция распространяется все дальше на восток страны, в ранее благополучные регионы. В 2011–2015 гг. в среднем за год регистрировалось 50 очагов неблагополучия у домашних свиней, а за последние 2 года этот показатель вырос в 3,6 раза (рис. 1).

По другим вирусным болезням – КЧС, БА, РРСС – имеется некоторое улучшение эпизоотической ситуации, что отчасти можно связать с широкомасштабной вакцинацией свиней. Однако обратной стороной длительной массовой иммунизации животных (традиционными препаратами) является возможность формирования вакцинозависимости свиноводческих хозяйств. При этом отказ от вакцинации ведет к манифестации неблагополучия, прежде маскируемого специфической

Рис. 1. Динамика неблагополучия и проведения вакцинации по/против АЧС, КЧС, БА, РРСС у домашних свиней в РФ за 2011–2017 гг. (данные МЭБ, ФГБУ «ЦВ»)



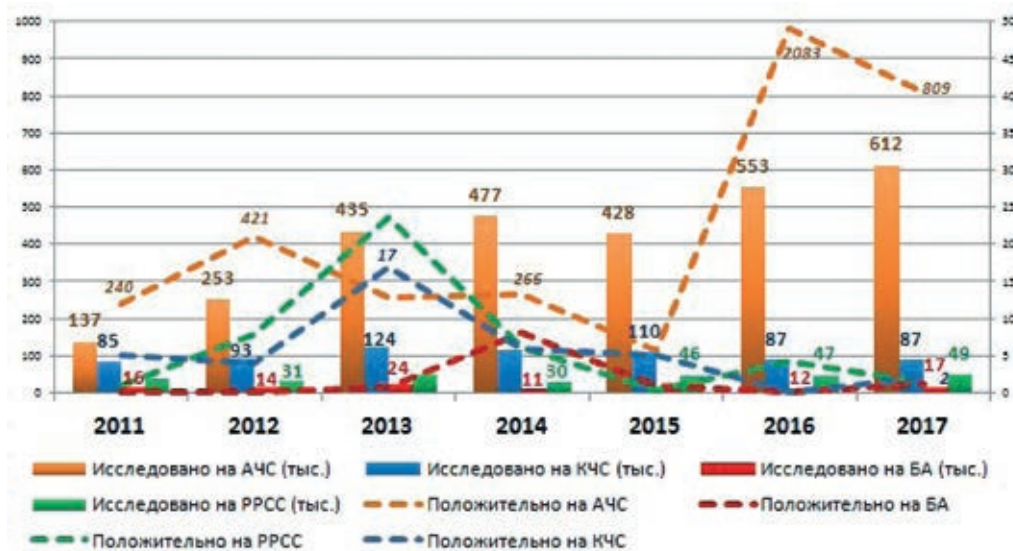


Рис. 2. Динамика проведения лабораторных исследований на АЧС, КЧС, БА, РПС в РФ за 2011–2017 гг. (данные ФГБУ «ЦВ»)

профилактикой. Меры борьбы с заболеванием в таких случаях чаще всего будут сводиться к возобновлению проведения иммунизации свиней, поскольку нотификация вспышки инфекции означает для свиноводческого хозяйства значительные экономические потери из-за введения соответствующих ограничений.

Несмотря на снижение числа неблагополучных пунктов по КЧС, регистрируемых в популяции домашних свиней (с 8 в 2011 г. до 1 в 2017 г.), ежегодно увеличивается число проводимых в РФ вакцинаций против данного заболевания (за 7 лет – в 1,7 раза). В нашей стране массово применяют живые вакцины против КЧС, поскольку существующие DIVA-вакцины дороже и уступают вирусвакцинам по иммуногенности, особенно по способности формировать раннюю и колостральную защиту [9, 10].

Для иммунизации свиней против БА в России также широко используют не DIVA-вакцины, несмотря на имеющийся ассортимент маркированных препаратов против БА, которые по иммуногенным свойствам вполне сопоставимы с традиционными вакцинами [8]. Действующие инструкции по применению таких препаратов предписывают проводить иммунизацию свиней только в неблагополучных и угрожаемых по БА хозяйствах. При этом ежегодный объем иммунизаций против БА в РФ составляет 12 млн головообработок, что не соотносится с декларируемым в нашей стране за последние 4 года благополучием по БА.

По данным ветеринарной отчетности, за последние 7 лет было зарегистрировано 22 неблагополучных по РПС пункта. Объем ежегодных вакцинаций против РПС в России составлял около 4 млн головообработок.

Лабораторная диагностика вирусных болезней свиней в России осуществляется в рамках выполнения различных программ как регионального, так и федерального уровня. Уполномоченные в области ветеринарии органы исполнительной власти субъектов РФ собирают и в установленные сроки направляют сведения (по утвержденным формам 4-вет А, 4-вет Б) о проведенных диагностических исследованиях в Минсельхоз России (данные обрабатываются в ФГБУ «ЦВ») [6, 7]. Анализ

этих сведений показывает, что объем проводимых в РФ за последние годы исследований на АЧС, КЧС, БА, РПС в целом сопоставим с уровнем опасности, представляемым этими инфекциями. Так, на АЧС проведено исследований в 4 раза больше, чем на КЧС, и в 26 раз больше, чем на БА (рис. 2).

Представляемые сведения позволяют судить лишь об общих объемах исследований, проводимых в стране, поскольку доступные для анализа отчетные данные не содержат сведений об использованных методах лабораторной диагностики.

В связи с этим детальному анализу были подвергнуты более подробные отчеты 32 лабораторий, подведомственных Россельхознадзору, где с 2011 г. в соответствии с приказами «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО» проводятся исследования по выполнению Плана государственного эпизоотологического мониторинга особо опасных болезней животных (далее – государственный мониторинг). Сведения о результатах исследований по мере их выполнения вносятся в ГИС «Ветис». В конце года учреждения, задействованные в реализации государственного мониторинга, представляют итоговые отчеты о выполненных исследованиях для их последующего анализа, проводимого в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [1, 3].

В рамках государственного мониторинга проводится наблюдение за такими заразными болезнями свиней, как АЧС, КЧС, БА, РПС, трансмиссивный гастроэнтерит свиней (ТГС), рожа, пастереллез, сальмонеллез, хламидиоз, трихинеллез и др. В зависимости от объекта наблюдения (заразного агента) различается число исследований и используемые методы лабораторной диагностики. В качестве последних используются методы, рекомендованные МЭБ [12]:

- обнаружение генетического материала вируса с использованием различных вариантов полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- идентификация вируса с помощью реакции прямой иммунофлуоресценции (РПИФ);

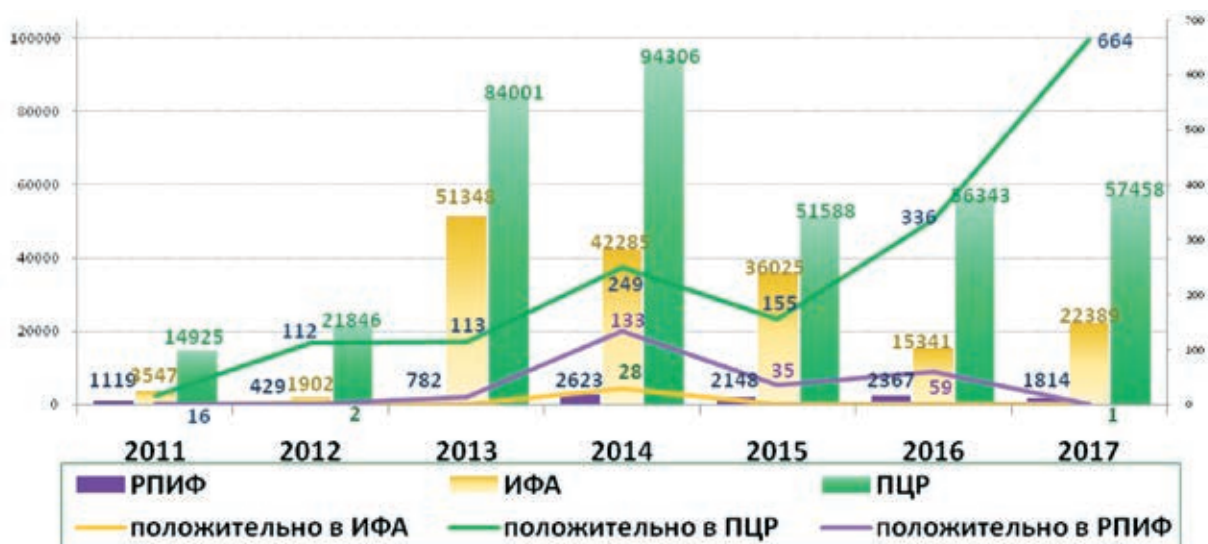


Рис. 3. Лабораторные исследования на АЧС, проводимые в России в рамках государственного мониторинга (данные ГИС «Ассоль»)

- вирусыведение на чувствительных культурах клеток;
- постановка биопробы с использованием лабораторных животных;
- обнаружение антигена вируса или специфических антител к нему с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА).

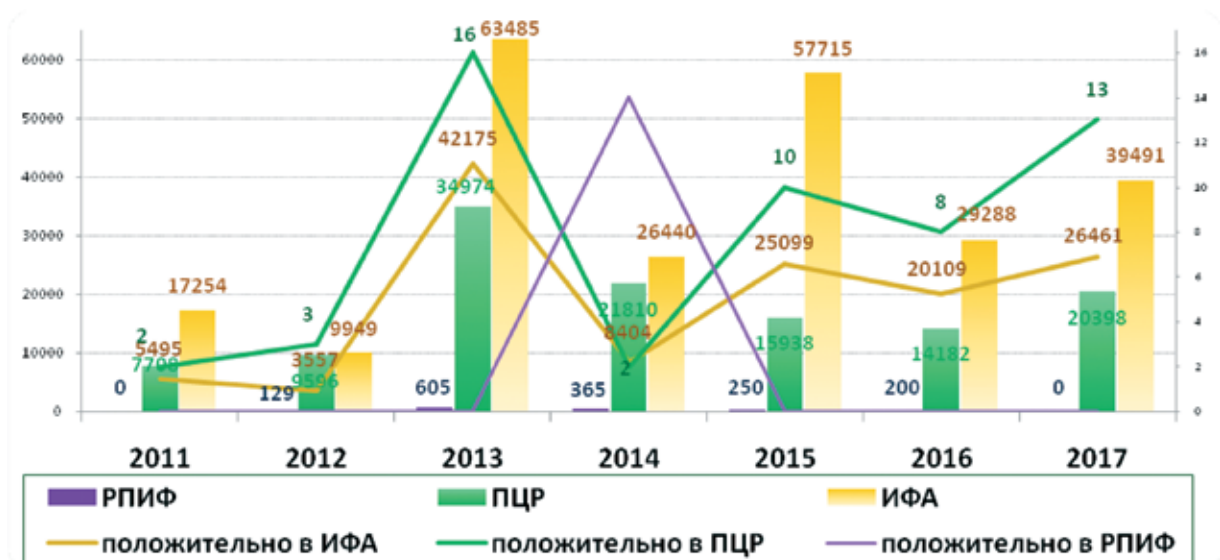
Динамика проведения лабораторных исследований на АЧС в рамках государственного мониторинга (рис. 3) свидетельствует, что за последние 7 лет выполнено более 550 тыс. тестирований на АЧС, из них подавляющая часть – с помощью методов ПЦР (67%) и ИФА (31%). При проведении 380 тыс. исследований методом ПЦР выявлено 1645 положительных проб (0,4%), а 173 тыс. исследований методом ИФА (обнаружение антител к вирусу АЧС) – только 31 (0,018%). При этом 28 из этого числа – в разгар эпизоотии АЧС

на одном из крупных свинокомплексов Тульской области в 2014 г.

В то же время, по данным европейских ветеринарных служб, за период с 2014 по 2017 г. в Эстонии обнаружено 350 проб от диких кабанов, имеющих антитела к вирусу АЧС (I. Nurmoja, 2017), в Польше – более 150 таких проб (G. Wozniakowski, 2017), в Литве – более 90 (S. Pileviciene, 2017). Суммарно за упомянутый период в перечисленных странах было исследовано около 115 тыс. проб от диких кабанов, при этом с каждым годом увеличивалась выявляемая серопревалентность (в основном за счет отстрелянных животных): с 0,1% в 2014 г. до 0,4% в 2015 г., 0,6% в 2016 г. и 1,0% в 2017 г.

При лабораторной диагностике АЧС часто в качестве первичного теста применяют ПЦР, а для верификации получаемых результатов положительные и со-

Рис. 4. Лабораторные исследования на КЧС, проводимые в России в рамках государственного мониторинга (данные ГИС «Ассоль»)



мнительные пробы дополнительно исследуют в РПИФ и/или методом вирусыведения, что подтверждается высоким числом положительных результатов при данных исследованиях. Так, из 11,7 тыс. проб, исследованных методом РПИФ, выявлено 249 положительных (2%), а из 1 517 проб, исследованных методом вирусыведения, – 606 (40%).

Динамика проведения лабораторных исследований на КЧС (рис. 4) свидетельствует, что наибольшее число диагностических исследований реализовано с помощью ИФА: за 7 лет их проведено более 243 тыс. (65,9% от общего числа). На метод ПЦР приходится 33,7% тестирований, а на метод РПИФ – всего 0,4%.

Анализ имеющейся отчетности показал, что наибольшее число позитивных результатов получено при тестировании проб методом ИФА (54%). Однако эти результаты сложно интерпретировать. Так, по отчетам ряда лабораторий, в отдельных регионах страны все исследованные в ИФА пробы были серонегативными к КЧС, чего быть не должно, поскольку повсеместно применяются вакцины против данного заболевания. Либо при заполнении форм отчета обнаружение антител у свиней в привитых стадах не считалось за положительные случаи (чтобы не спутать с неблагополучием), либо массово исследовались карантинруемые, непривитые свиньи, завезенные из-за рубежа, однако последнее не соответствует назначению проведения мониторинговых исследований.

Данные отчетов других лабораторий указывают, что в ряде регионов страны (Московская, Курская, Орловская обл. в 2014 г.; Калининградская, Курская, Орловская обл. в 2015 г.; Забайкальский край, Иркутская обл., Республика Алтай в 2016 г.) были выявлены специфические антитела к вирусу КЧС в пробах от животных из непривитого стада, что может указывать на инфицирование животных. Между тем за анализируемый период в перечисленных регионах случаи КЧС не регистрировались. К сожалению, по отчетам ветлабораторий (в том числе в ГИС «Ассоль») отсутствует возможность проследить проведение последующих лабораторных исследований для доказательства отсутствия инфекции в подозрительных субпопуляциях животных.

Методом ПЦР за 7 лет получено 54 положительных результата на обнаружение генома вируса КЧС, а в РПИФ число позитивных проб составило 14. Количество нотифицированных за эти годы вспышек КЧС не совпадает с приведенными данными, поскольку не все выявленные случаи были диагностированы в рамках проведения государственного мониторинга. Кроме того, в одном и том же очаге, как правило, исследовали не одну пробу.

Несмотря на вышеуказанное, результаты ПЦР и РПИФ истолковать не в пример проще, чем результаты, полученные в ИФА. Тем более что потенциально имеется возможность точной дифференциальной диагностики, какой вирус КЧС обнаружен – вакцинный или полевой (по результатам проведения рестрикционного анализа/секвенирования).

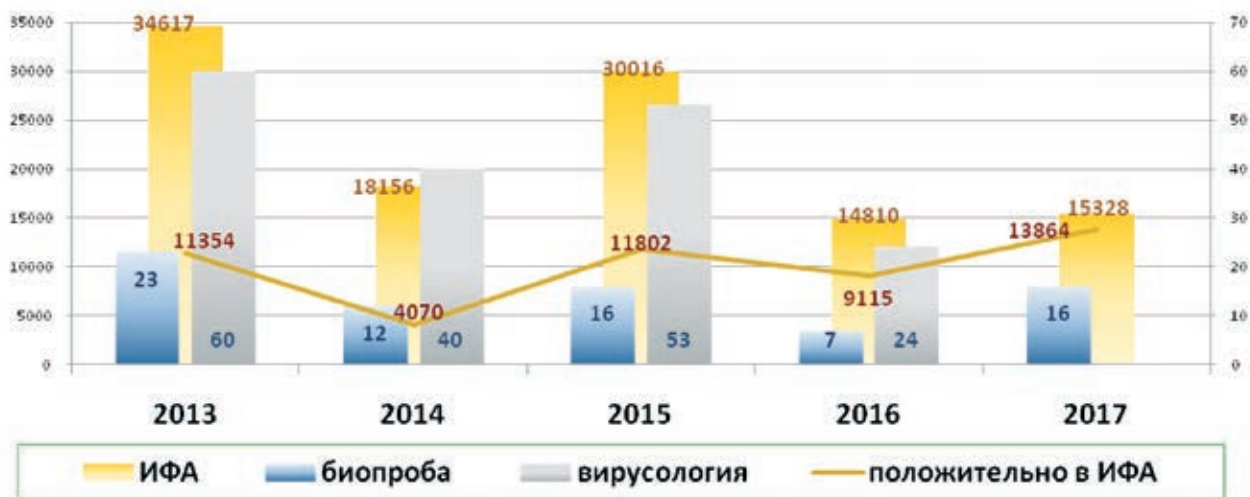
С целью изучения биологических свойств выделенных изолятов и пополнения коллекции микроорганизмов в ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводились исследования по выделению вируса КЧС на чувствительных культурах клеток. За анализируемый период проведено 343 таких исследования.

Динамика проведения лабораторных тестирований на БА (рис. 5) свидетельствует, что с помощью прямых методов (вирусология, биопроба) проведено 251 исследование, при этом результаты оказались отрицательными.

Подавляющая масса всех исследований на БА (до 99,8%) проводилась с помощью косвенных методов (обнаружение специфических антител в ИФА). В то же время из-за массового применения в России вакцин против БА сложно интерпретировать полученные в ИФА результаты (44% положительных).

Так, по отчетам ряда ветлабораторий, имелись случаи выявления специфических антител к вирусу БА в пробах от свиней из стада, не подвергавшегося вакцинации (Белгородская, Воронежская, Московская обл., Красноярский, Ставропольский края в 2014 г.; Республика Хакасия, Красноярский, Ставропольский края, Свердловская обл. в 2015 г.; Иркутская обл., Ставропольский край в 2016 г.; Республики Бурятия, Хакасия, Забайкальский, Красноярский, Ставропольский края,

Рис. 5. Лабораторные исследования на БА, проводимые в России в рамках государственного мониторинга (данные ГИС «Ассоль»)



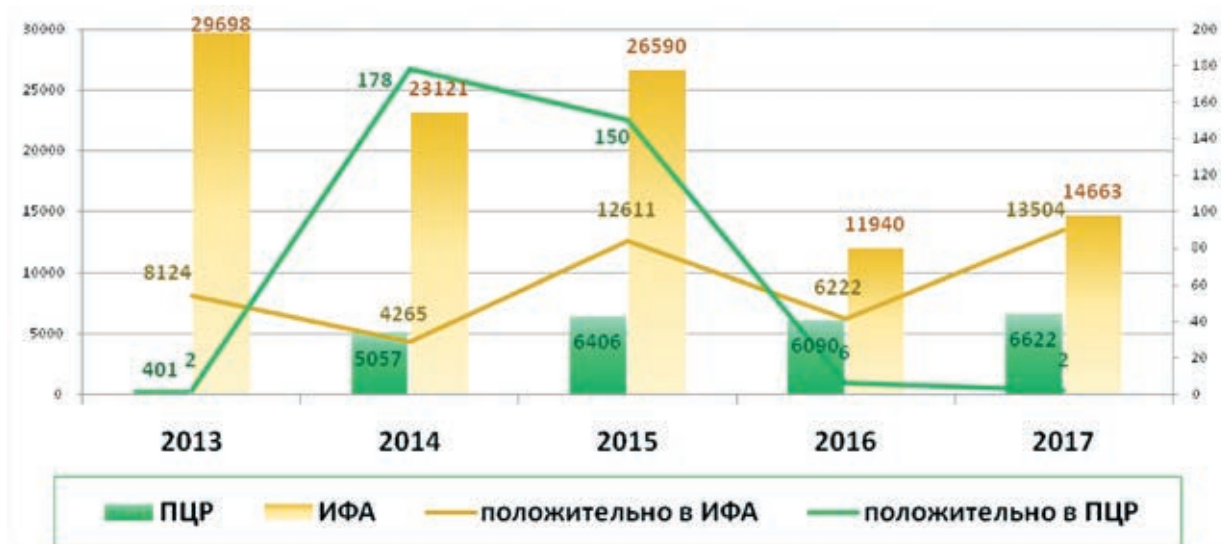


Рис. 6. Лабораторные исследования на РРСС, проводимые в России в рамках государственного мониторинга (данные ГИС «Ассоль»)

Иркутская, Свердловская обл. в 2017 г.). Это вызывает настороженность, поскольку по имеющимся отчетам нет возможности уточнить, проведены ли в полном объеме мероприятия, доказывающие благополучие по БА в упомянутых стадах.

Динамика проведения лабораторных тестирований на РРСС (рис. 6) свидетельствует, что наибольшее количество исследований (81%) выполнялось с помощью ИФА, при этом значительная часть проб (31%) оказались положительными, что может объясняться отсутствием нормативных ограничений по проведению исследований (косвенными методами) по фону вакцинированного поголовья.

Из 11 581 проведенного методом ПЦР исследования 328 имели положительный результат (2,8%), что указывает на неблагополучие ряда свиноводческих хозяйств России по РРСС. О том же может свидетельствовать обнаружение антител к вирусу РРСС у животных из непривитых стад (Белгородская, Курская обл., Приморский, Хабаровский края в 2015 г.; Тюменская, Новосибирская обл., Приморский, Хабаровский края в 2016 г.; Курская Свердловская, Тверская, Иркутская обл., Приморский, Пермский края в 2017 г.). В отчетных данных за 2017 г. имеются сведения об обнаружении в ИФА проб, «положительных по наличию патогена», в Московской (599 проб), Новосибирской (20), Псковской (3), Свердловской (20), Томской (6), Тюменской (4) обл. и в Республике Башкортостан (1).

Проведенный анализ упомянутых отчетных данных указывает, что при отсутствии в РФ регламентирующих надзорных программ выполняемые лабораторные исследования не всегда отвечают основным целям надзора. Так, трудно считать обоснованным подтверждение проведения вакцинации массовыми исследованиями методом ИФА. Тем более что оценку эффективности вакцинации целесообразнее проводить по количественным методологиям. Например, реакция нейтрализации, в отличие от ИФА, позволяет не только установить факт наличия специфических антител, но и определить титр вируснейтрализующих антител.

Другой неразумной крайностью будет и отказ от использования метода ИФА, поскольку при его корректном применении получают однозначные результаты (при обнаружении как антигена, так и антител), свидетельствующие об инфицировании не подвергавшихся вакцинации животных, а дискриминирующие ИФА-наборы для обнаружения маркер-антител представляют ценную возможность выявления инфицированных животных среди привитых DIVA-вакциной против КЧС, БА и др.

Однако простота, дешевизна, скорость постановки ИФА, возможность проведения массовых исследований не должны являться определяющими факторами для выбора данного метода в качестве основного. К тому же чаще чувствительность ИФА (например, по обнаружению антигена) уступает другим тестам, таким как ПЦР, РПИФ, вирусыведение. Исходя из вышеперечисленного, было бы рациональным установление ряда ограничений по применению метода ИФА в рамках государственного мониторинга.

Так, следует отказаться от исследований по обнаружению специфических антител у животных после вакцинации (за исключением DIVA-вакцин против КЧС, БА) или для раннего обнаружения АЧС в благополучных по заболеванию субъектах РФ (поскольку последнее результативнее проводить с помощью ПЦР и РПИФ [2]). С учетом европейского опыта исследования методом ИФА по обнаружению антигена/антител АЧС следует дополнять тестированием в ПЦР проб от тех же подозрительных животных [12].

В настоящее время основой системы сбора ветеринарной отчетности в РФ являются сведения, предоставляемые субъектовыми ветеринарными учреждениями по установленным формам соответствующего регламента [7]. Недостатками данной системы являются ее трудоемкость и неоперативность, связанные с практически ручным сбором и обработкой информации, излишнее обобщение данных (например, по методологии проводимых исследований), разрозненность по объему предоставляемых сведений, отличающаяся достоверность информации по отдельным заразным болезням.

Устранению указанных недостатков может способствовать более широкое использование электронных информационных систем, например ГИС Россельхознадзора «Веста», «Ассоль», «Меркурий» и др. Интеграция указанных ГИС в единую среду (с объединением баз данных) способна значительно увеличить их функциональность и предоставит возможность использования их в качестве автоматизированных систем надзора и контроля за заразными болезнями животных.

Вместе с тем необходимо усовершенствовать существующие ГИС (в частности, «Ассоль», «Весту»), при этом требуется скорректировать протоколы ввода данных для однозначной интерпретации результатов исследований с усовершенствованием электронных форм отчетности не только для быстрой статистической обработки накапливаемых сведений, но и для эпизоотологического анализа, в том числе с возможностью отслеживать результаты исследований (как положительные, так и отрицательные) на уровне отдельных стад животных (с указанием численности обследуемой субпопуляции для оценки репрезентативности проводимых исследований). Функционал имеющихся систем требуется расширить сбором сведений по результатам проведения эпизоотологических расследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проводимые в РФ надзорные диагностические мероприятия необходимо документально регламентировать, с координацией на преследование основных целей надзора. Снижение затрат, связанных с реформированием действующей системы, возможно с помощью следующих действий:

- ранжирования списка подлежащих надзору болезней с сокращением числа исследований по тем из них, которые не несут потенциального риска причинения значительного ущерба;
- использования только тех методов тестирования, результаты которых можно однозначно интерпретировать при сложившейся эпизоотической ситуации;
- увеличения числа лабораторных исследований, проводимых при пассивном надзоре (инцидентная диагностика), за счет сокращения активного надзора в тех случаях, когда сомнительны преследуемые цели проведения исследований и/или невозможно обеспечить обследование репрезентативных выборок проб на уровне, соответствующем превалентности заболевания и требуемой достоверности исследований;
- регламентации рационального порядка тестирования проб с определением возможности их пулиро-

вания для первичного обследования сходных групп животных, отказа от дублирующих исследований (отправки в референтные лаборатории уже исследованных отрицательных проб);

- составления общего плана исследований, выполняемого как в рамках федерального плана мониторинга, так и в рамках субъектовных программ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветис. Государственная информационная система в области ветеринарии. – URL: <http://vetrf.ru/>.
2. Диагностические оценки ПЦР и РПИФ при использовании выборки от полевых вспышек африканской чумы свиней / В. В. Куриннов, А. П. Васильев, С. А. Белянин [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2014. – № 3. – С. 5–9.
3. Методика расчета репрезентативного количества лабораторных исследований биоматериала от сельскохозяйственных животных, проводимых в рамках государственного эпизоотического мониторинга заразных, в том числе особо опасных болезней животных на территории Российской Федерации / Министерство сельского хозяйства РФ, Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. – М., 2012. – 61 с.
4. Методические положения по проведению пассивного и активного мониторинга африканской чумы свиней: утв. РАСХН 10.10.2011 / Д. В. Колбасов, В. В. Куриннов, А. П. Васильев [и др.]. – Покров. – 2011. – 25 с.
5. Методические рекомендации по расчету необходимого количества лабораторных исследований биоматериала от животных с целью повышения эффективности проведения мониторинговых исследований в отношении АЧС / А. А. Шевцов, А. С. Першин, С. Г. Ремыга [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2015. – 25 с.
6. Официальный интернет-портал ФГБУ «Центр ветеринарии». – URL: <http://центр-ветеринарии.рф/>.
7. Регламент предоставления информации в систему государственного информационного обеспечения в сфере сельского хозяйства: утв. МСХ РФ № 189 от 02.04.2008.
8. Batza H.-J. Eradication of Aujeszky's disease in Germany // Proc. International Conference on the Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination. – Buenos Aires, 2004. – P. 81–82.
9. Classical Swine Fever – An Updated Review / S. Blome [et al.] // Viruses. – 2017. – Vol. 9, No 4:86. – doi: 10.3390/v9040086.
10. Oirschot J. T. Vaccinology of classical swine fever: From lab to field // Vet. Microbiol. – 2003. – Vol. 96. – P. 367–384.
11. Martin S. W., Meek A. H., Willeberg P. Veterinary Epidemiology. Principles and Methods. – Ames: Iowa State University Press, 1987. – 343 p.
12. World Organisation for Animal Health (OIE). – URL: <http://www.oie.int>.

ЯЩУР FOOT-AND-MOUTH DISEASE

УДК 619:578.835.2:57.083.2

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА О, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЮЖНОЙ КОРЕИ

А. А. Фунтиков¹, С. Р. Кременчугская², Т. К. Майорова³, С. Н. Фомина⁴, Д. А. Лозовой⁵, В. М. Захаров⁶

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

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

³ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mayorova@arriah.ru

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

⁵ Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁶ Профессор, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zaharov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты адаптации изолятов вируса ящура типа О, полученных из Агентства по карантину животных и растений Республики Корея, к культурам клеток и организму свиней, изучения их инфекционной и антигенной активности, стабильности при пассировании в перевиваемой культуре клеток ПСГК-30. Проведено изучение антигенного соответствия полевых изолятов вируса ящура типа О 2014–2015 гг., полученных из Агентства по карантину животных и растений Республики Корея, российским и зарубежным производственным штаммам вируса ящура типа О. Особое внимание уделено подбору дозы заражения для культивирования вируса в клеточной линии ПСГК-30 с целью последующего получения антигенных препаратов и противоящурных вакцин. Результаты изучения штаммов послужили основанием для депонирования их в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Ключевые слова: вирус ящура, Республика Корея, культура клеток, свиньи, антигенное соответствие.

UDC 619:578.835.2:57.083.2

STUDYING IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FMDV TYPE O ISOLATES RECOVERED IN THE SOUTH KOREA

A. A. Funtikov¹, S. R. Kremenchugskaya², T. K. Mayorova³, S. N. Fomina⁴, D. A. Lozovoy⁵, V. M. Zaharov⁶

¹ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: funtikov@arriah.ru

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

³ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mayorova@arriah.ru

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

⁵ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁶ Professor, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: zaharov@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents the results of adaptation of FMDV Type O isolates obtained from the Animal and Plant Quarantine Agency to pig cell cultures and organisms as well as studies of their infectivity, antigenic activity as well as stability during passages in the PSGK continuous cell culture. Antigenic matching of FMDV Type O isolates, 2014-2015, obtained from the Animal and Plant Quarantine Agency of the Republic of Korea, with Russian and foreign FMDV Type O production strains was studied. Special attention was given to determination of the inoculation dose for virus cultivation in PSGK-30 for the purpose of subsequent preparation of antigenic preparations and FMD vaccines. The results of strain studies served a basis for their depositing into the FGBI "ARRIAH" strain collection.

Key words: FMD virus, Republic of Korea, cell culture, pigs, antigenic matching.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур является особо опасной острой вирусной болезнью сельскохозяйственных и диких парнокопытных животных, характеризуется значительным снижением продуктивности больных животных и высокой смертностью молодняка. Опасность болезни обусловлена высокой контагиозностью, способностью к быстрому распространению в виде эпизоотий и панзоотий, частой изменчивостью и генетическим разнообразием штаммов, множественностью путей передачи инфекции, узкой специфичностью иммунитета у животных в пределах одного серотипа [6].

От заноса ящура не застрахована ни одна страна, даже с высоким уровнем ветеринарного обеспечения, а экономический ущерб для сельского хозяйства при заносе и дальнейшем распространении вируса может быть огромным [4].

За период с 2015 по 2016 г. в мире было зарегистрировано 59 неблагополучных по ящуру стран. Наибольшее их количество (32) находилось на Африканском континенте, где регистрировался ящур типов О, А, SAT-1, 2, 3. Вторым по значимости являлся Азиатский регион, где были отмечены 27 стран, неблагополучных по ящуру типов О, А, Азия-1, SAT-1, 2. За период с конца 2016 по 2017 г. в мире было выявлено 13 стран, на территории которых отмечались случаи заболевания, в том числе Республика Корея (Южная Корея).

Данные МЭБ о неблагополучии стран мира по ящуру свидетельствуют о стационарном присутствии вируса в популяциях восприимчивых животных двух континентов. В странах Азиатского региона заболевание было отмечено среди крупного рогатого скота (КРС), буйволов, свиней, овец и коз. На Африканском континенте – в основном среди КРС, в меньшей степени – среди буйволов, овец и коз.

На рис. 1 представлена карта, отражающая эпизоотическую ситуацию по ящуру в Азиатско-Тихоокеанском

ском регионе за период с 2014 по 2016 г., на которой видно, что наибольшее распространение здесь приобрел ящур типа О, за ним следует тип А и после него – тип Азия-1 [7, 10].

Так, в июле 2014 г. в Республике Корея была зарегистрирована эпизоотия ящура среди свиней, вызванная штаммом вируса O/SEA/Mya-98. В период с декабря 2014 по апрель 2015 г. было зарегистрировано 185 очагов ящура свиней, в пяти очагах были отмечены единичные случаи заболевания КРС. Вспышки ящура продолжались в стране до марта 2016 г. В начале февраля 2017 г. в стране были зафиксированы 8 вспышек ящура типа О, через несколько суток на территории региона также была отмечена вспышка ящура типа А, ликвидация эпизоотии продолжалась более месяца [3, 8, 9]. Ввиду данной эпизоотической ситуации остро встал вопрос получения вакцин и диагностических препаратов на основе актуальных эпизоотических изолятов, выделенных на территории Республики Корея.

Поскольку ящур типа О распространен в Азиатско-Тихоокеанском регионе, существует риск заноса вируса на территорию Российской Федерации. Изучение соответствия изолятов, выделенных в Республике Корея, производственным штаммам вируса ящура типа О, используемым в ФГБУ «ВНИИЗЖ», наиболее значимо для субъектов Дальнего Востока РФ.

Проблемы культивирования вируса ящура обсуждаются научным сообществом довольно давно, но проведенные многочисленные исследования не отражают всех особенностей репродукции вируса. В культурах клеток накопление вируса ящура никогда не проходит одинаково и зависит от множества факторов, влияющих на адсорбцию [1].

Для выделения, титрования и выращивания вируса на данный момент предложены линии клеток: СП, IB-RS-2, ПСГК-30 и другие [2]. Все перечисленные клеточные культуры по-разному чувствительны к вирусу ящура, поэтому не на всех культурах можно получить

Рис. 1. Эпизоотическая ситуация по ящуру в Азиатско-Тихоокеанском регионе в 2014–2016 гг. (на 03.10.2016)
URL: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/foreign/2016/september/yashur_asia.pdf



вирусный материал с высоким титром инфекционной активности и содержанием вирусспецифического белка. Следовательно, культивирование вируса в данных клеточных линиях требует индивидуального подхода практически для каждого штамма вируса ящура.

Целью данной работы было изучение изолятов вируса ящура, полученных из Республики Корея, с применением вирусологических и серологических методов. Ввиду особенностей культивирования выбранного для детального изучения изолята (относительно низкое накопление вирусного антигена при достаточно высокой инфекционной активности) задачей исследования было определение оптимальной дозы заражения, при которой наблюдается наивысшее накопление вирусного материала в культурах клеток за определенный отрезок времени.

Следующей задачей было оптимизировать условия культивирования производственного штамма вируса ящура O/KOR/JC02D1/2014 и в дальнейшем использовать эти данные при масштабной репродукции с целью получения диагностических и вакцинных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус ящура. В 2016 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из Агентства по карантину животных и растений Республики Корея были переданы 6 изолятов вируса ящура типа O, принадлежащего к топотипу SEA, выделенных от свиней и КРС на территории этой страны во время вспышек 2014–2015 гг. Для адаптации вируса было проведено по 5 последовательных пассажей к первичной культуре клеток (КК) почки теленка и затем к перевиваемой КК почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21). Титры инфекционной активности в КК ВНК-21 составляли 6,0–7,16 Ig ТЦД₅₀/см³.

Репродукция вируса в культурах клеток. Для изучения репродукции изолятов использовали перевиваемые КК почки сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почки свиньи (IB-RS-2). В пластиковые флаконы с площадью роста 25 см² с полностью сформированным монослоем вносили поддерживающие среды ПСС и Игла соответственно и исходную вирусную суспензию в соотношении 1:10. Зараженные культуры инкубировали при 37 °С до момента проявления цитопатического действия (ЦПД). Учет и фотографирование пораженных вирусом клеток осуществляли с помощью светового лабораторного инвертированного микроскопа Axio Vert. A1 фирмы Carl Zeiss. Признаком адаптации изолята к КК являлось наличие ЦПД на 90–95% поверхности монослоя в течение 18–24 ч.

Титрование вируса ящура в культуре клеток. Адаптированные к КК изоляты титровали микрометодом. С этой целью на питательной среде Игла готовили 10-кратные разведения каждой вирусной суспензии и вносили в 3-кратной повторности в лунки 96-луночного микропланшета, в которые затем добавляли суспензию перевиваемой КК IB-RS-2. Учет результатов титрования по характерному ЦПД вируса проводили через 72 ч и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³.

Антигенные свойства изолятов в реакции микронейтрализации. При изучении антигенных свойств использовали реакцию микронейтрализации (PMH) с референтными сыворотками крови, полученными от естественно восприимчивых животных, вакцинированных на имеющиеся в ФГБУ «ВНИИЗЖ» производственные штаммы вируса ящура: O₁ Маниса

(европейский вакцинный штамм), O Тайвань 3/97, O₁ Campros (южноамериканский вакцинный штамм), O PanAsia-2 (Саудовская Аравия/2008), O № 2102/Забайкальский/2010 (Россия/2010) и O № 2212/Приморский/2014.

Исследование антигенных свойств изолятов проводили согласно «Методическим рекомендациям по определению антигенного соответствия между эпизоотическими изолятами и производственными штаммами вируса ящура в перекрестной реакции микронейтрализации» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 16.11.2012). Титр референтных сывороток крови против 100 ТЦД₅₀ гомологичного и гетерологичного вируса определяли в PMH при перекрестном титровании сыворотки с пятью дозами вируса, рассчитывали с использованием уравнения линейной регрессии и выражали в Ig. Показатель антигенного родства (значение r₁) находили как антилогарифм разности Ig титров сыворотки против гетерологичного и гомологичного вируса.

Результаты PMH интерпретировали следующим образом:

– при r₁ ≥ 0,3 – полевой изолят и производственный штамм являются близкородственными, вакцина из производственного штамма должна защищать от эпизоотического вируса;

– при r₁ < 0,3 – полевой изолят отличается от производственного штамма, вакцина из данного штамма неспособна защищать от эпизоотического вируса;

– r₁ = 0,28...0,32 – пограничное значение.

Реизоляция вируса на свиньях. Животных 3–4-месячного возраста заражали вирусом ящура методом внутрикожных инъекций в область венчика копытец в 4 точки по 0,1 см³, следующие пассажи проводили 10%-й вирусной суспензией, полученной из афтозного материала. Проявление клинических признаков ящура учитывали через каждые 12 ч по наличию созревших афт на месте введения вирусного материала.

Титрование вируса на свиньях. Титрование 10%-й суспензии вируса ящура из афт с глицерином (āā) осуществляли в соответствии с СТО 00495527-0130-2009 «Штаммы вируса ящура от свиней контрольные».

Учет титрования вируса на свиньях производили через 24–48 ч по наличию афт на месте введения разведенный вируссодержащего материала. Титр инфекционной активности выражали в Ig ИД₅₀/0,1 см³.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Активность антигена вируса ящура в культуральных и афтозных суспензиях определяли методом непрямого двойного сэндвич-варианта ИФА с использованием «Набора для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом» в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией, утвержденной директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» 4 апреля 2015 г.

Статистическая обработка результатов. Результаты, полученные в ходе исследований, статистически обрабатывали в программе для работы с электронными таблицами Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусные материалы, полученные из Республики Корея, вызывали ЦПД в КК ПСГК-30 и IB-RS-2 в течение 15–24 ч, начиная с первого пассажа.

Результаты определения инфекционной и антигенной активности изолятов, адаптированных к КК ПСГК-30 на уровне второго пассажа, представлены в таблице 1.

Таблица 1
Инфекционная и антигенная активность корейских изолятов вируса ящура, адаптированных к КК ПСГК-30 ($n = 3$)

| Показатель | Изолят | | | | | |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| | O/KOR/JC35/2015 | O/KOR/JC71/2015 | O/KOR/JC84/2015 | O/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-11) | O/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-2) | O/KOR/JC02D6/2014 |
| Титр инфекционной активности в КК IB-RS-2 ($\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) | $6,58 \pm 0,14$ | $6,67 \pm 0,14$ | $7,17 \pm 0,28$ | $7,5 \pm 0,17$ | $7,25 \pm 0,25$ | $6,75 \pm 0,25$ |
| Титр антигенной активности в ИФА (разведения) | 1:16 | 1:32 | 1:32 | 1:16 | 1:64 | 1:32 |

Титры инфекционной активности изолятов, репродуцированных в КК ПСГК-30, находились в пределах ($6,58 \pm 0,14$) – ($7,5 \pm 0,17$) $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а их антигенная активность в ИФА составляла 1:16–1:64. При этом наивысшую антигенную активность проявлял изолят O/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-2) при титре инфекционной активности $7,25 \pm 0,25 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Поэтому данный изолят был выбран для дальнейших исследований.

Результаты изучения в РМН антигенного соответствия (значение r_1) изолятов российским производственным штаммам вируса ящура типа О и зарубежным штаммам, входящим в состав вакцин, используемых на территории Республики Корея, представлены в таблице 2.

Корейские изоляты, выделенные от свиней, антигенно отличаются от производственных штаммов O₁ Маниса, O Тайвань 3/97, O₁ Campos, O PanAsia-2 ($r_1 = 0,01 \dots 0,18$), но имеют антигенное родство с российскими производственными штаммами O № 2102/Забайкальский/2010 и O № 2212/Приморский/2014, принадлежащими к топотипу SEA ($r_1 = 0,33 \dots 0,76$). Изоляты, выделенные от КРС, кроме близкородственных отношений внутри топотипа SEA ($r_1 = 0,45 \dots > 1,0$) продемонстрировали также антигенное родство со штаммом O Тайвань 3/97 ($r_1 = 0,37 \dots 0,6$).

Полученные данные об отсутствии антигенного родства корейских изолятов 2014–2015 гг. со штаммом O₁ Маниса и антигенном соответствии штаммам, принадлежащим топотипу SEA (O/SKR/7/10), согласуются с результатами Всемирной справочной лаборатории (Пербрайт) [9].

В условиях вивария при ФГБУ «ВНИИЗЖ» была проведена реизоляция вируса O/KOR/JC02D1/2014 с титром инфекционной активности в КК IB-RS-2 $7,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, адаптированного к КК ПСГК-30, на свиньях. Для этого культуральный вирус 2-го пассажа вводили животным, всего было осуществлено 3 последовательных пассажа. В 1-м пассаже появление афт отмечали только через 52 ч после заражения, при этом у животных первичные афты отсутствовали, но отмечалась генерализация инфекции, наличие афт было отмечено на копытном мякише и в области уголков губ. При внешнем осмотре было установлено наличие общей слабости, повышение температуры тела и отказ от корма. При проведении 2-го пассажа наличие афт было выявлено через 36 ч после заражения, у свиней наблюдали те же признаки генерализации, что и при первичном заражении. При осуществлении 3-го пассажа созревание афт на месте введения вируса наступило через 24 ч, при этом отмечали значительное их увеличение с наличием большого количества афтозной лимфы. Из отобранного на каждом пассаже вирусного материала готовили 10%-ю суспензию для последующего определения инфекционной активности в КК IB-RS-2. Афтозный материал 3-го пассажа также исследовали с целью определения инфекционной активности на свиньях и антигенной активности – в ИФА. В таблице 3 показаны результаты определения титра инфекционной и антигенной активности вируса ящура в 10%-х афтозных суспензиях 1–3-го пассажей.

Из представленных данных следует, что при пассировании вируса на свиньях титр его инфекционной активности существенно не изменялся и находился

Таблица 2
Антигенное соответствие корейских изолятов производственным штаммам вируса ящура типа О ($n = 2$)

| Изоляты | Производственные штаммы | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------|-------------|-----------------------------|--------------------------|
| | O ₁ Маниса | O Тайвань 3/97 | O ₁ Campos | O PanAsia-2 | O № 2102/Забайкальский/2010 | O № 2212/Приморский/2014 |
| O/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-2) свиной | 0,03 | 0,06 | 0,01 | 0,02 | 0,33 | 0,64 |
| O/KOR/JC02D6/2014 свиной | 0,05 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,35 | 0,41 |
| O/KOR/JC84/2015 свиной | 0,18 | 0,09 | 0,12 | 0,17 | 0,54 | 0,69 |
| O/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-11) свиной | 0,04 | 0,07 | 0,18 | 0,02 | 0,55 | 0,76 |
| O/KOR/JC71/2015 КРС | 0,23 | 0,37 | 0,15 | 0,1 | 0,62 | 0,45 |
| O/KOR/JC85/2015 VR1500129 КРС | 0,32 | 0,6 | 0,09 | 0,17 | > 1,0 | 0,73 |

Таблица 3
Инфекционная и антигенная активность вируса ящура O/KOR/JC02D1/2014 в 10%-й афтозной суспензии (n = 3)

| Показатель | 1-й пассаж | 2-й пассаж | 3-й пассаж |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Титр инфекционной активности в КК IB-RS-2 (lg ТЦД ₅₀ /см ³) (± 0,25) | 6,58 ± 0,14 | 7,58 ± 0,14 | 7,08 ± 0,14 |
| Титр инфекционной активности на свиньях (lg ИД ₅₀ /0,1 см ³) | н/и | н/и | 5,5 ± 0,25 |
| Титр антигенной активности в ИФА (разведения) | н/и | н/и | 1:256 |

н/и – не исследовали.

Таблица 4
Антигенная активность вируса ящура O/KOR/JC02D1/2014 в различных разведениях при заражении КК ПСГК-30

| Показатель | Разведение вируса | | | | | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 10 ^{-1,0} | 10 ^{-2,0} | 10 ^{-3,0} | 10 ^{-4,0} | 10 ^{-5,0} | 10 ^{-6,0} |
| Время наступления ЦПД (ч) | 15–18 | 21 | 24 | 27 | 30 | 30 |
| Титр антигенной активности в ИФА (разведение) | 1:64 | 1:64 | 1:128 | 1:64 | 1:64 | 1:32 |

в пределах (6,58 ± 0,14) – (7,58 ± 0,14) lg ТЦД₅₀/см³. Титр инфекционной активности афтозного материала 3-го пассажа на свиньях составил 5,5 ± 0,25 lg ИД₅₀/0,1 см³. Вирус был типоспецифичен и активен в ИФА в разведении 1:256.

Из числа методов, описанных в работах по успешной адаптации вируса ящура с целью репродукции в КК, был избран метод подбора дозы заражения [2, 5].

В 6 пластиковых флаконов с монослойной КК ПСГК-30 вносили разведения вируса ящура от 10^{-1,0} до 10^{-6,0} на поддерживающей среде ПСС и инкубировали при 37 °С. Данные по изучению в ИФА антигенной активности расплектов вируса, полученных при подборе дозы заражения, представлены в таблице 4.

Полное ЦПД (95–100%) наблюдали через 15–18 ч после заражения вирусом в разведении 10^{-1,0}, через

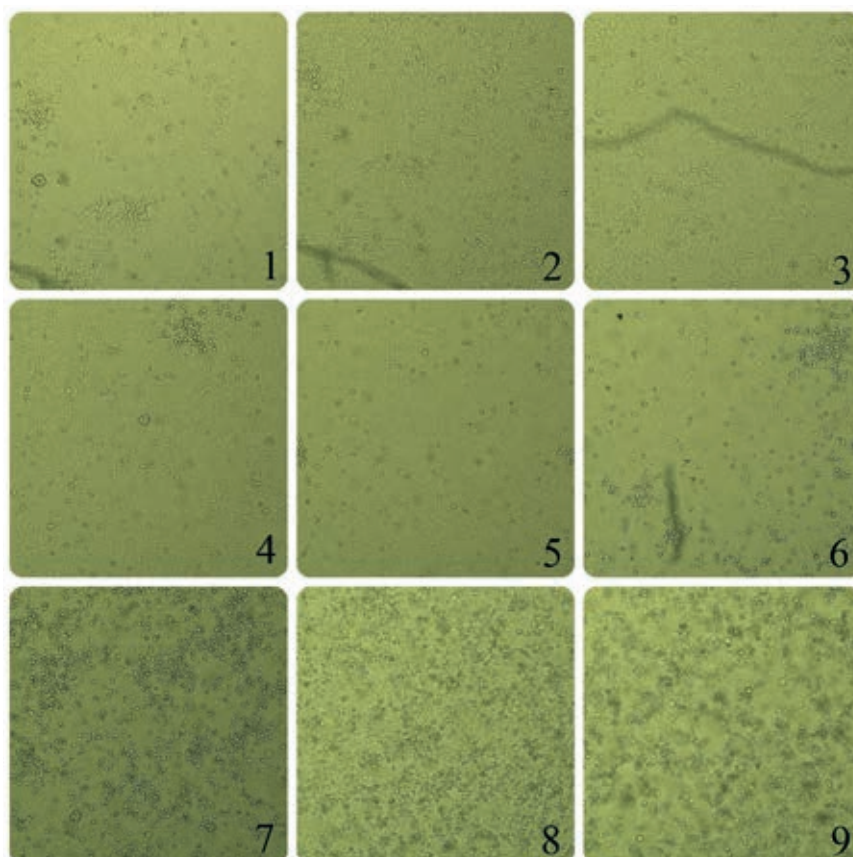


Рис. 2. Динамика ЦПД в КК ПСГК-30 при заражении вирусом ящура O/KOR/JC02D1/2014 в разведении 10⁻³

- 1 – монослой до внесения вирусного материала;
- 2–5 – монослой через 2, 6, 9, 12 ч после заражения;
- 6 – начало проявления ЦПД, скопление округлых мертвых клеток через 15 ч после заражения;
- 7–8 – развитие ЦПД через 18–21 ч после внесения вируса;
- 9 – полное разрушение монослоя через 24 ч после заражения.

Таблица 5
Биологическая активность штамма O/KOR/JC02D1/2014
при репродукции в КК ПСГК-30 путем последовательных пассажей (n = 3)

| Пассаж | Срок наступления ЦПД, ч | Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /см ³ |
|--------|-------------------------|--|
| 1 | 24 | 6,33 ± 0,14 |
| 2 | 24 | 7,25 ± 0,25 |
| 3 | 20 | 7,08 ± 0,28 |
| 4 | 18 | 6,00 ± 0,25 |
| 5 | 18 | 6,41 ± 0,14 |

21–27 ч – после внесения разведений вируса $10^{-2.0}$ – $10^{-4.0}$ и через 30 ч – разведений $10^{-5.0}$ – $10^{-6.0}$. При дозе заражения $10^{-3.0}$ время наступления ЦПД увеличивалось до 24 ч за счет снижения дозы заражения (рис. 2), при этом антигенная активность вируса в ИФА возрастала до 1:128, что является максимальным значением данного показателя для различных доз заражения. В связи с этим для культивирования вируса ящура в КК ПСГК-30 в матрасах емкостью 1500 см³ с целью получения антигена была выбрана доза заражения $10^{-3.0}$.

Для последующего использования штамма O/KOR/JC02D1/2014 (02 D1-2) в производстве биопрепаратов был проведен опыт по изучению его стабильности при проведении 5 последовательных пассажей в перевиваемой КК ПСГК-30 (табл. 5). Для этого каждый последовательный пассаж вируса титровали в перевиваемой КК IB-RS-2.

Штамм O/KOR/JC02D1/2014 в течение всех пассажей проявил стабильно высокие титры биологической активности, составляющие $(6,00 \pm 0,25)$ – $(7,25 \pm 0,25)$ Ig ТЦД₅₀/см³, при уменьшении срока проявления ЦПД с 24 до 20–18 ч в 3–5-м пассажах.

По результатам изучения выбранный штамм вируса ящура в виде образцов «производственный» и «контрольный свиной» под регистрационным номером O № 2271/KOR/JC02D1/2014 депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» для изготовления диагностических препаратов, вакцин и их контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена адаптация штамма KOR/JC02D1/2014 вируса ящура типа O к перевиваемым культурам клеток свиного происхождения, а также к организму свиней. Подобрана доза заражения для репродукции вируса в культуре клеток ПСГК-30, а также для заражения монослойных культур клеток и дальнейшей наработки вирусного сырья с целью получения диагностических и вакцинных препаратов. Изучена стабильность вируса

при проведении 5 последовательных пассажей в культуре клеток ПСГК-30.

Изоляты вируса ящура, выделенные от свиней и КРС на территории Республики Корея, по результатам тестирования в РМН являются антигенно родственными производственным штаммам O № 2102/Забайкальский/2010 и O № 2212/Приморский/2014, принадлежащим к топотипу SEA. Следовательно, вакцина, изготовленная из данных производственных штаммов, будет защищать иммунизированное поголовье от циркулирующего в Республике Корея вируса ящура.

Штамм вируса ящура под регистрационным номером O № 2271/KOR/JC02D1/2014 депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» для изготовления диагностических препаратов, вакцин и их контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян Л. П., Пономарев А. П. Влияние различных методов концентрирования вируса ящура на его структуру и компонентный состав // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тез. докл. науч. конф. ВНИИЯИ. – Владимир, 1983. – С. 43–45.
2. Клеточные культуры в биотехнологии противоящурных препаратов / В. Н. Герасимов, Н. И. Герасимова, Е. Е. Федорова [и др.] // Проблемы инфекционной патологии с.-х. животных. – Владимир, 1997. – С. 41–42.
3. Лозовой Д. А., Рахманов А. М. Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в 2013–2015 гг. и меры борьбы с ним // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1 (16). – С. 38–42.
4. Новые перспективы иммунопрофилактики ящура / А. И. Дудников, В. В. Михалишин, С. А. Дудников [и др.] // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2000. – С. 52–57.
5. Ходакова Н. Н., Стариков В. А., Михалишин Д. В. Заражение суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 малыми дозами вируса ящура, репродуцированного в перевиваемой линии ПСГК-30 // Рос. вет. журн. С.-х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – Сент. – С. 21–23.
6. Ящур: монография / А. Н. Бурдов, А. И. Дудников, П. В. Малярец [и др.]; под ред. А. Н. Бурдова. – М.: Агропромиздат, 1990. – 320 с.
7. Foot-and-Mouth Disease Situation. Monthly Report September 2014. – URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/docs/FMD_monthly_reports/Final_September2014.pdf (дата обращения: 30.08.17).
8. The Pirbright Institute. – URL: http://www.wrlfmd.org/ref_labs/ref_lab_reports/OIEFAO%20FMD%20Ref%20Lab%20Report%20Jan-Mar%202015.pdf (дата обращения: 30.08.17).
9. World Animal Health Information System (WAHIS) / OIE. – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?fupser=&dothis=&reportid=22735 (дата обращения: 30.08.17).
10. World Organization for Animal Health. – URL: <http://web.oie.int/hs2/report.asp> (дата обращения: 30.08.17).

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ВНК-21/2-17 И КОЛИЧЕСТВО ИММУНОГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИРУСА ЯЩУРА

М. А. Шевченко¹, М. Н. Гусева², Д. А. Лозовой³, М. И. Доронин⁴, Д. В. Михалишин⁵, В. В. Михалишин⁶

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

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

³ Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁴ Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: doronin@arriah.ru

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

⁶ Главный эксперт ИАЦ, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mihalishin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Исходным сырьем для приготовления гидролизата белков крови служит цельная кровь животных, ее сгустки и другие отходы сывороточного производства. Отмечена зависимость продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17 от сезона заготовки сырья для гидролизата. Гидролизат белков крови из сырья, полученного в летние месяцы, стимулировал рост клеток в 1,2–1,3 раза больше по сравнению с гидролизатом, изготовленным в осенне-зимний период (различия существенны, $p < 0,001$). Количество иммуногенных компонентов вируса ящура из «летнего» гидролизата белков крови было больше в 1,3–1,6 раза по сравнению с полученным в другие сезоны года (различия существенны, $p < 0,001$). Найдена прямая зависимость между продуктивностью клеточной линии ВНК-21/2-17, концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура и сезонной динамикой содержания следующих аминокислот, входящих в гидролизат белков крови: аланина, аспарагина, валина, гистидина, глицина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина. Для увеличения продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17 и концентрации иммуногенных компонентов вируса ящура предложено в культуральную ростовую среду для выращивания суспензионной культуры клеток в осенне-зимний период наряду с гидролизатом белков крови дополнительно добавлять некоторые аминокислоты.

Ключевые слова: гидролизат белков крови, аминокислоты, месяцы года, продуктивность, иммуногенные компоненты вируса ящура.

UDC 619:578.835.2:57.082.26: 612.124

INFLUENCE OF CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION OF BLOOD PROTEIN HYDROLYSATE ON THE PRODUCTIVITY OF BHK-21/2-17 CELL LINEAGE AND AMOUNT OF FMDV IMMUNOGENIC COMPONENTS

M. A. Shevchenko¹, M. N. Guseva², D. A. Lozovoy³, M. I. Doronin⁴, D. V. Mikhailishin⁵, V. V. Mikhailishin⁶

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

² Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁴ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: doronin@arriah.ru

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

⁶ Chief Expert, Information and Analysis Centre, Doctor (Veterinary Medicine), Professor FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mihalishin@arriah.ru

SUMMARY

The raw material for blood protein hydrolysate preparation is whole animal blood, its clots and other serum production wastes. The dependence of BHK-21/2-17 cell lineage productivity on the season of hydrolysate raw material preparation was observed. Cell growth stimulated by blood protein hydrolysate from raw material prepared in summer months 1.2–1.3 times exceeded cell growth stimulated by blood protein hydrolysate prepared in autumn-winter period (differences are significant, $p < 0,001$). The amount of FMDV immunogenic components from “summer” blood protein hydrolysate 1.3–1.6 exceeded the amount obtained during other seasons of the year (differences are significant, $p < 0,001$). There was found a direct correlation between BHK-21/2-17 cell lineage productivity, concentration of FMDV immunogenic components and seasonal dynamics of the contents of the following amino acids composing blood protein hydrolysates: alanin, asparagine, valine, histidine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, proline, serine, tyrosine, threonine, tryptophane, and phenylalanine. To increase BHK-21/2-17 cell lineage productivity and concentration of FMDV immunogenic components it was suggested to add some additional amino acids into the culture growth medium for suspension cell culture in autumn-winter period together with blood protein hydrolysate.

Key words: blood protein hydrolysate, amino acids, months of the year, productivity, FMDV immunogenic components.

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия в биотехнологии сформировано и интенсивно развивается направление, связанное с конструированием питательных сред, содержащих в качестве источников аминокислот ферментативные гидролизаты белков животных и растений [5, 7].

Установлено, что для роста клеток позвоночных вне организма необходимы 13 аминокислот (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин, аргинин, глутамин, гистидин, тирозин, цистин) [2, 10].

Белковые гидролизаты представляют собой продукты расщепления протеина до аминокислот и простых пептидов. Гидролизаты обычно состоят из аминокислот с вариабельной концентрацией, а также пептидов разной молекулярной массы [4, 8]. Гидролизат белков крови (ГБК) содержит достаточное количество аминокислот, необходимых для роста клеток линии ВНК-21/2-17 [6].

Все аминокислоты участвуют в биосинтезе разнообразных белков. Выполнение аминокислотой той или иной функции *in vitro* во многом зависит от условий культивирования клеток. Одной из причин необходимости присутствия в среде аминокислот, которые не требуются для целого организма, является их ограниченный синтез в культуре [4, 11].

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

рых клеток синтезировать их, либо для компенсации их утечки в среду [13].

Различные аминокислоты потребляются из культуральной среды растущими клетками с неодинаковой скоростью. Отмечено, что регулярное добавление аргинина (20–40 мг/дм³) и увеличение количества глутамина до 450 мг/дм³ повышали интенсивность роста у взвешенных культур [12]. Кроме того, в процессе культивирования аминокислоты, как правило, утилизируются только на 20–25%, при этом pH среды снижается обычно на 0,4–0,7 единицы [7].

ГБК является сырьем для изготовления ростовых сред при культивировании суспензии клеток ВНК-21/2-17 [6, 9], но, к сожалению, в литературе практически не встречаются данные о влиянии сезонных изменений аминокислотного состава ГБК на продуктивность и концентрацию иммуногенных компонентов вируса ящура.

Целью работы было изучение влияния изменений аминокислотного состава ГБК в зависимости от сезона заготовки сырья на продуктивность клеточной линии ВНК-21/2-17 и количество иммуногенных компонентов вируса ящура.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. В работе использовали суспензионную перевиваемую культуру клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

Культивирование клеток. Клетки выращивали согласно «Промышленному регламенту на производство вакцины против ящура различных типов» в металлических культиваторах с рабочим объемом до 1800 дм³.

Гидролизат белков крови. В процессе культивирования клеток использовали гидролизат белков крови жидкий, полученный из ООО НПП «Биохимсервис».

Вирус ящура. Для заражения использовали культуральный вирус ящура типов А, О, Азия-1.

Определение концентрации и жизнеспособности клеток. Концентрацию клеток линии ВНК-21/2-17 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови. Жизнеспособность оценивали путем учета количества живых клеток с использованием 1%-го водного раствора трипанового синего.

Определение продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17. Продуктивность рассчитывали как отношение конечной концентрации клеток к исходной в одном пассаже.

Рис. 1. Продуктивность суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

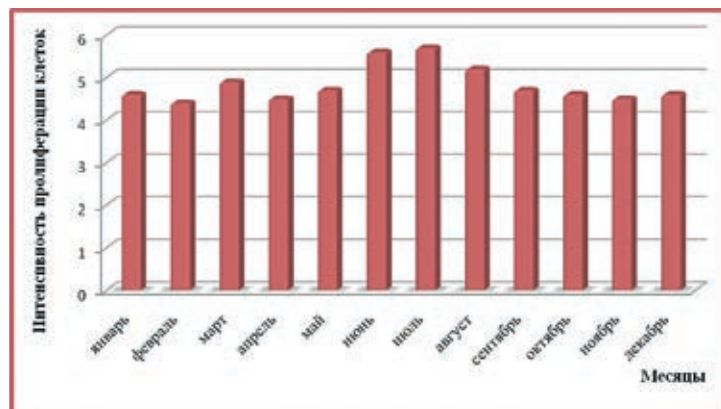


Таблица 1

Продуктивность суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

| Показатель | Январь | Февраль | Март | Апрель | Май | Июнь | Июль | Август | Сентябрь | Октябрь | Ноябрь | Декабрь |
|--------------------------------|--------|---------|------|--------|-----|------|------|--------|----------|---------|--------|---------|
| Продуктивность средняя (M) | 4,6 | 4,4 | 4,9 | 4,5 | 4,7 | 5,6 | 5,7 | 5,2 | 4,7 | 4,6 | 4,5 | 4,6 |
| Стандартная ошибка ($\pm m$) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Количество опытов (n) | 119 | 72 | 115 | 95 | 88 | 107 | 80 | 24 | 85 | 89 | 85 | 84 |

Измерение концентрации общего вирусного белка и компонентов вируса ящура осуществляли в соответствии с «Методикой определения содержания вирусспецифического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной РСК» [1].

Оценку аминокислотного состава ГБК проводили в соответствии с методикой М-04-38-2009 «Корма, комбикорма и сырье для их производства. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза “Капель”».

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки полученных результатов вычисляли значение средней арифметической и ее ошибку. Степень различия между средними двух выборок оценивали с помощью критерия Стьюдента (*t*), который представлял собой отношение разности между средними к ошибке этой разности. Для характеристики линейной корреляции между двумя признаками вычисляли коэффициент корреляции (*R*), который может принимать значение от +1 до -1 в зависимости от тесноты связи. При полной прямой корреляции *R* = 1, при полной обратной *R* = -1. Когда корреляция отсутствует, коэффициент близок к 0. Как правило, величина *R* в интервале 0,20–0,30 свидетельствует о наличии слабой, 0,50–0,60 – средней, 0,80–0,90 – сильной (тесной) корреляции между признаками [3].

Уровень значимости отражал степень достоверности полученных данных и показывал вероятность случайного возникновения исследуемых показателей; в опытах его коэффициент составлял не более 0,05 (5%) [3].

Цифровой материал статистически обрабатывали на персональном компьютере общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях, проведенных ранее, изучали зависимость аминокислотного состава ГБК от сырья, полученного в разные сезоны года. Отметим, что содержание аминокислот менялось по сезонам. Пик, как правило, приходился на летние месяцы, когда их количество увеличивалось в 1,2–2,3 раза, а в осенне-зимний период оно понижалось в 1,2–1,4 раза (различия существенны, *p* < 0,05). Пик роста для глутаминовой и аспарагиновой кислот приходился на ноябрь, когда их количество было в 1,4 раза больше, чем в предыдущие месяцы (*p* < 0,01).

Таким образом, отмечали прямую зависимость динамики содержания аминокислот в ГБК и физиолого-биохимических показателей крови крупного рогатого скота (КРС) (так как для приготовления ГБК исходным сырьем являлась цельная кровь КРС, ее сгустки и другие отходы сывороточного производства) от сезонов года.

На данном этапе работы определяли продуктивность клеточной линии ВНК-21/2-17 в суспензии с исследуемым ГБК. Гидролизат белков крови из сырья, заготовленного в летние месяцы, стимулировал рост суспензии клеток в 1,2–1,3 раза больше по сравнению с остальными сезонами года (различия существенны, *p* < 0,001) (табл. 1, рис. 1).

Выявлена корреляция между продуктивностью и динамикой сезонного колебания содержания аминокислот в ГБК (табл. 2). Коэффициент корреляции изменялся в пределах от -0,367 до 0,947, что свидетельствовало о слабой, средней или тесной зависимости между признаками. Корреляционной связи между содержанием аргинина, аспарагиновой кислоты и продуктивностью клеток не обнаружено. Глутаминовая кислота имела обратную слабую корреляцию с продуктивностью (*R* = -0,367). Пролин, аспарагин, изолейцин, метионин, серин, тирозин имели среднюю степень корреляции с продуктивностью, при этом *R* составлял

Рис. 2. Концентрация иммуногенных компонентов вируса ящура при репродукции в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК



Таблица 2

Концентрация иммуногенных компонентов вируса ящура при репродукции в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

| Показатель | Январь | Февраль | Март | Апрель | Май | Июнь | Июль | Август | Сентябрь | Октябрь | Ноябрь | Декабрь |
|---|--------|---------|------|--------|------|------|------|--------|----------|---------|--------|---------|
| Концентрация 146S + 75S в 1 млн клеток (мкг/см³), среднее (M) | 0,50 | 0,51 | 0,54 | 0,60 | 0,70 | 0,78 | 0,74 | 0,67 | 0,58 | 0,52 | 0,60 | 0,57 |
| Стандартная ошибка (±m) | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,13 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,02 | 0,04 | 0,04 |
| Количество опытов (n) | 116 | 80 | 129 | 119 | 85 | 102 | 73 | 28 | 78 | 91 | 80 | 86 |

Таблица 3
Корреляция между динамикой сезонного колебания состава аминокислот в ГБк, продуктивностью клеток ВНК-2/2-17 и количеством иммунных компонентов вируса ящура

| Аминокислота | Содержание, мкг/см ³ | | | | | | | | | | | | R1 | R2 |
|------------------------------|---------------------------------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|----------|---------|--------|---------|--------|--------|
| | Январь | Февраль | Март | Апрель | Май | Июнь | Июль | Август | Сентябрь | Октябрь | Ноябрь | Декабрь | | |
| Аланин | 5638,9 | 4908,0 | 6463,3 | 4426,9 | 5457,0 | 7274,3 | 7272,7 | 5785,0 | 5265,9 | 5956,3 | 5531,1 | 5664,4 | 0,863 | 0,566 |
| Аргинин | 1702,2 | 1867,3 | 1134,2 | 1326,2 | 1772,5 | 1768,9 | 1607,8 | 1653,3 | 2300,0 | 1366,1 | 2030,0 | 2756,0 | -0,189 | -0,006 |
| Аспарагин | 2068,8 | 1768,6 | 1497,2 | 2458,6 | 2190,0 | 2967,7 | 2705,7 | 2296,7 | 2153,8 | 2258,1 | 2225,2 | 2171,4 | 0,621 | 0,772 |
| Аспарагиновая кислота | 4028,1 | 4677,9 | 6889,6 | 3126,9 | 3282,5 | 3898,2 | 4269,2 | 4000,0 | 4278,1 | 4391,1 | 6361,7 | 4786,1 | -0,124 | -0,356 |
| Валин | 5565,9 | 5022,0 | 6112,5 | 4767,7 | 5489,5 | 7689,2 | 7380,1 | 5863,3 | 5364,4 | 6184,9 | 5554,6 | 5875,2 | 0,884 | 0,646 |
| Гистидин | 3525,2 | 3146,7 | 3663,3 | 2929,2 | 3496,0 | 4661,9 | 4506,7 | 3603,3 | 3295,0 | 3802,2 | 3614,6 | 3641,6 | 0,854 | 0,657 |
| Глицин | 2535,6 | 2144,0 | 2610,8 | 2153,8 | 2555,5 | 3642,4 | 3534,2 | 2990,0 | 2577,5 | 2742,1 | 2571,8 | 2548,0 | 0,947 | 0,768 |
| Глутаминовая кислота | 4563,0 | 5558,7 | 5529,2 | 3673,8 | 3577,0 | 4045,5 | 4475,0 | 4295,0 | 4953,8 | 5231,4 | 7315,9 | 5286,4 | -0,367 | -0,465 |
| Изолейцин | 1152,9 | 1074,3 | 884,7 | 1015,6 | 652,7 | 1490,4 | 1570,6 | 1096,7 | 1121,3 | 1120,5 | 972,9 | 1177,8 | 0,681 | 0,383 |
| Лейцин | 7711,7 | 6845,7 | 7046,3 | 8090,0 | 7413,3 | 10308,0 | 10443,6 | 7120,0 | 7085,6 | 7640,5 | 7500,8 | 7977,4 | 0,780 | 0,717 |
| Лизин | 6655,6 | 5684,0 | 7320,4 | 5288,5 | 6803,0 | 8935,0 | 9011,5 | 7833,3 | 6504,4 | 7660,7 | 6774,3 | 6818,8 | 0,893 | 0,651 |
| Метионин | 1509,6 | 1192,7 | 1553,3 | 1538,5 | 1971,0 | 1824,5 | 1758,1 | 1458,3 | 1320,0 | 1379,3 | 1301,1 | 1396,8 | 0,595 | 0,746 |
| Пролин | 2037,0 | 1784,1 | 2471,7 | 1957,7 | 2213,5 | 2867,8 | 2864,6 | 2630,0 | 2206,9 | 2492,5 | 2896,4 | 3163,6 | 0,499 | 0,452 |
| Серин | 3701,9 | 3408,7 | 3965,4 | 3071,8 | 3803,2 | 4293,3 | 4510,5 | 4491,7 | 3886,3 | 4185,0 | 4166,8 | 4285,6 | 0,651 | 0,461 |
| Тирозин | 871,5 | 693,3 | 1248,3 | 640,8 | 930,0 | 1102,2 | 1204,7 | 1433,3 | 943,8 | 1238,6 | 1019,6 | 1004,8 | 0,598 | 0,313 |
| Треонин | 3671,9 | 3282,0 | 4457,1 | 3225,4 | 3987,0 | 5021,4 | 5208,5 | 4998,3 | 3772,5 | 4700,4 | 3931,8 | 3892,5 | 0,855 | 0,607 |
| Триптофан | 1157,8 | 1112,1 | 1205,4 | 1043,8 | 1116,0 | 1528,8 | 1443,7 | 1470,0 | 1107,5 | 1395,0 | 1188,2 | 1124,0 | 0,819 | 0,567 |
| Фенилаланин | 4541,5 | 4107,3 | 4952,9 | 3791,5 | 4708,0 | 5748,5 | 6019,0 | 4790,0 | 5061,3 | 4967,1 | 4967,5 | 5204,4 | 0,774 | 0,587 |

Показатели для корреляционного анализа

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|-----|------|---|---|
| $C_{146S+75S}$ в 1 млн клеток (МКГ/СМ ²) | 0,5 | 0,51 | 0,54 | 0,6 | 0,7 | 0,78 | 0,74 | 0,67 | 0,58 | 0,52 | 0,6 | 0,57 | - | - |
| Продуктивность клеток | 4,6 | 4,4 | 4,9 | 4,5 | 4,7 | 5,6 | 5,7 | 5,2 | 4,7 | 4,6 | 4,5 | 4,6 | - | - |

R1 – коэффициент корреляции между продуктивностью клеток и сезонным содержанием аминокислот в ГБк;

R2 – коэффициент корреляции между концентрацией иммунных компонентов вируса ящура и сезонным содержанием аминокислот в ГБк;

$C_{146S+75S}$ – концентрация иммунных компонентов 146S и 75S культурального вируса ящура.

0,774–0,947. Остальные аминокислоты, такие как аланин, валин, гистидин, глицин, лейцин, лизин, треонин, триптофан, фенилаланин, имели прямую высокую корреляцию с продуктивностью клеток (R находился в пределах 0,774–0,947).

Обнаружена корреляция между количеством иммуногенных компонентов вируса ящура и динамикой сезонного колебания содержания аминокислот в ГБК. При этом коэффициент корреляции R изменялся в пределах от $-0,356$ до $0,772$, что свидетельствовало о слабой или средней корреляции между признаками. Корреляция между содержанием аргинина и концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура не выявлена. Зависимость выхода $146S + 75S$ -компонентов от количества аспарагиновой и глутаминовой кислот имела обратную слабую корреляцию – R составлял $-0,356$ и $-0,465$ соответственно. Прямую слабую связь между признаками наблюдали также с тирозином, изолейцином, пролином, серином (R находился в пределах $0,313$ – $0,461$). Остальные аминокислоты, такие как аланин, аспарагин, валин, гистидин, глицин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин, имели прямую среднюю корреляцию с выходом иммуногенных компонентов вируса ящура (R составлял $0,566$ – $0,772$).

Гидролизат белков крови из сырья, заготовленного в летние месяцы, стимулировал увеличение концентрации иммуногенных компонентов вируса ящура при репродукции его в суспензии клеток в $1,3$ – $1,6$ раза больше по сравнению с остальными сезонами года (различия существенны, $p < 0,001$) (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, обнаружена зависимость между сезонными колебаниями концентрации аминокислот в ГБК, продуктивностью клеток и количеством иммуногенных компонентов вируса ящура после репродукции в клеточной линии ВНК-21/2-17, выращенной с использованием ГБК (табл. 3). При этом во всех случаях отсутствовала корреляция с аргинином и аспарагиновой кислотой. Для остальных аминокислот наблюдали разную степень зависимости между продуктивностью и концентрацией иммуногенных компонентов вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований изучено влияние сезонного изменения аминокислотного состава гидролизата белков крови на продуктивность клеточной популяции ВНК-21/2-17 и количество иммуногенных компонентов вируса ящура.

Отмечена зависимость продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17 от сезона заготовки сырья для ГБК. Выявлена прямая зависимость между продуктивностью клеточной линии ВНК-21/2-17, концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура и сезонной динамикой изменения содержания аланина, аспарагина, валина, гистидина, глицина, изолейцина, лейцина,

лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина, входящих в гидролизат.

Для увеличения продуктивности клеточной популяции ВНК-21/2-17 и концентрации иммуногенных компонентов вируса ящура в культуральную ростовую среду для выращивания суспензионной культуры клеток в осенне-зимний период наряду с ГБК целесообразно дополнительно добавлять такие аминокислоты, как аланин, аспарагин, валин, гистидин, глицин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин, до уровня, сравнимого с их содержанием в сырье, заготовленном в летние месяцы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков: метод. материал. – Суздаль: Влад. НИИ сел. хоз-ва, 1994. – 92 с.
2. Гидролизаты молочных мышечных и растительных белков как основы питательных сред для культивирования клеток и вирусов / Л. П. Дьяконов, Г. М. Строкина, А. Ф. Конюхов [и др.] // Цитология. – 1994. – Т. 36, № 6. – С. 522–524.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
4. Дьяконов Л. П. Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействия клеток с инъекционными патогенами // Цитология. – 1994. – Т. 36, № 6. – С. 503–504.
5. Ермакова Н. В. Сезонность и технологический стресс в животноводстве // Ученые записки Орловского гос. ун-та. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2014. – № 3 (59). – С. 148–151.
6. Изучение изменений аминокислотного состава питательных сред в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17 / М. Н. Гусева, Д. А. Лозовой, Е. Г. Кузнецова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2014. – № 3. – С. 35–42.
7. Конюхов А. Ф. Метаболические потребности клеточных культур сельскохозяйственных животных и конструирование питательных сред на основе отечественных компонентов // Ветеринарная иммунология и биотехнология. – 1988. – Т. 66. – С. 125–129.
8. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 636 с.
9. Оптимизация состава питательных сред для культивирования суспензии клеток ВНК-21/2-17 / М. Н. Гусева, Д. В. Михалишин, А. А. Шишкова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 4. – С. 35–39.
10. Питательные среды для выращивания культур клеток и вирусов / Н. Н. Гизитдинов [и др.] // Достижения науки и техники. – 1992. – № 6. – С. 22–23.
11. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. – М: Библионика, 2007. – 524 с.
12. Строкина Г. М. Конструирование питательных сред для культивирования клеток животных на основе гидролизатов белков сыворотки молока // Питательные среды и сыворотки для культивирования клеток: тез. докл. Всесоюз. конф., Кольцово, 14–17 окт. 1991. – Новосибирск, 1991. – С. 12.
13. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практ. руководство. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. – 691 с.

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЛЕЦИТИНА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

Е. В. Кузьмина¹, М. П. Семенов², Е. В. Тяпкина³, В. А. Соболев⁴

¹ Ведущий научный сотрудник, доктор ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар, e-mail: niva1430@mail.ru

² Заведующий отделом, доктор ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар

³ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар

⁴ Аспирант, Краснодарский НИВИ, г. Краснодар

РЕЗЮМЕ

Представлены данные по оценке эффективности лецитинового препарата при экспериментальном токсическом поражении печени лабораторных животных. Эксперименты проведены на крысах, содержащихся в одинаковых условиях, прошедших карантинный режим вивария и не имеющих внешних признаков заболеваний. Группы животных формировались по принципу парных аналогов. Острое токсическое поражение печени моделировали однократным введением четыреххлористого углерода (0,3 мг/кг массы тела). Установлено, что на второй день после введения крысам четыреххлористого углерода зарегистрированы внешние признаки интоксикации: отказ от корма, угнетение, одышка, повышение температуры тела. Применение *per os* рапсового лецитина за час до введения гепатотоксиканта и далее ежедневно в последующие 30 дней в дозе 1 мл/кг массы тела снижает клинические проявления интоксикации и повышает сохранность крыс. Фармакологический эффект лецитина проявляется улучшением биохимических параметров и функционального состояния печени лабораторных животных на фоне экспериментального острого гепатита. Полученные данные могут послужить основанием для применения рапсовых лецитинов в качестве гепатопротекторов природного происхождения с возможностью их использования как биологически активных добавок или действующих начал лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний печени у животных.

Ключевые слова: лецитин, фосфолипиды, гепатопротекторы, животные, токсическое поражение печени, экспериментальный гепатит.

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF LECITHIN-BASED PREPARATION ON EXPERIMENTAL ANIMAL LIVER TOXICITY

Ye. V. Kuzminova¹, M. P. Semenenko², Ye. V. Tyapkina³, V. A. Sobolev⁴

¹ Leading Researcher, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Scientific-Research Veterinary Institute, Krasnodar, e-mail: niva1430@mail.ru

² Head of the Department, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Scientific-Research Veterinary Institute, Krasnodar

³ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Scientific-Research Veterinary Institute, Krasnodar

⁴ Post-Graduate Student, Krasnodar Scientific-Research Veterinary Institute, Krasnodar

SUMMARY

Data on assessment of lecithin preparation effect on liver toxicity experimentally induced in laboratory animals are presented. Experiments were carried out in rats kept under similar conditions that had been subjected to quarantine in animal facilities and demonstrated no apparent disease manifestations. The animals were divided into groups based on paired counterparts' principle. Acute toxic damage of liver was induced by single administration of carbon tetrachloride (0.3 mg/kg of body weight). The rats demonstrated the following apparent signs of intoxication on day 2 after administration: anorexia, depression, dyspnea, fever. *Per os* administration of rape lecithin at a dose of 1 ml/kg of body weight one hour before hepatotoxicant administration and then daily for subsequent 30 days reduces intoxication manifestations and improves survivability of the rats. Pharmacological effect of lecithin includes biochemical characteristics improvement and functional state of liver of laboratory animals with experimentally induced acute hepatitis. Obtained data may provide grounds for application of lecithins as hepatoprotectors of natural origin in the form of biologically active supplements or active ingredients of pharmaceuticals intended for hepatic disease treatment in animals.

Key words: lecithin, phospholipids, hepatoprotectors, animals, toxic damages of liver experimentally induced hepatitis.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение гепатопатий, сложность диагностики и вариативность терапевтических подходов вызывают у ветеринарных специалистов большой интерес к вопросам изучения данной проблемы. Многообразие функций печени как главной биохимической лаборатории организма определяет высокую вероятность возникновения ранних обменных нарушений различных органов и систем при гепатопатологии. В связи с этим при заболеваниях гепатобилиарной системы потребность в гепатопротективных средствах, повышающих резистентность печени к действию химических агентов и нормализующих ее метаболизм в условиях напряжения детоксицирующей функции, в настоящее время остается высокой. При этом решающими факторами в пользу выбора препаратов подобной направленности являются безопасность, хорошая переносимость и возможность длительного приема [6, 7].

На протяжении последних лет накоплен положительный опыт изучения и применения препаратов, в состав которых входят лецитины, при гепатитах, дистрофии, циррозе печени [1, 3]. Лецитины – общее название группы жироподобных веществ, представляющих собой смесь фосфолипидов (65–75%) с триглицеридами и незначительным количеством других составляющих. Лецитин является основным структурным компонентом всех клеточных мембран, поддерживающим постоянство внутренней среды клеток и участвующим во всех энергетических и обменных реакциях. Эмульгирующие свойства лецитина позволяют ему обеспечивать оптимальный химический состав желчи, препятствовать образованию холестериновых желчных камней, растворять уже возникшие твердые жировые отложения на стенках желчного пузыря и в желчных протоках [2, 3].

Одним из важнейших свойств лецитина является защита клеток от токсикантов, которая частично осуществляется за счет ингибирования процессов перекисного окисления липидов. Фосфолипиды, восстанавливая «упаковку» полиненасыщенных жирных кислот в мембране гепатоцитов, уменьшают доступ кислорода к ним, тем самым снижая скорость зарождения свободных радикалов. Лецитин укрепляет стенки клеточной мембраны гепатоцитов, способствует регенерации ткани печени, а также помогает ей справляться с детоксикацией организма от ядов и ксенобиотиков [4, 5].

Все эти свойства определяют широкий спектр биологического и фармакологического действия лецитина, что делает актуальным поиск перспективных подходов к фармакологической коррекции поражений печени за счет разработки препаратов на основе эссенциальных фосфолипидов.

Цель исследований – оценка эффективности лецитинового препарата при экспериментальном токсическом поражении печени лабораторных животных, вызванном тетрахлорметаном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на беспородных лабораторных крысах со средней массой тела $205,7 \pm 3,1$ г. В опытах использовались животные, прошедшие карантинный режим вивария Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института

и не имеющие внешних признаков заболеваний. Крысы содержались в одинаковых условиях на обычном пищевом режиме.

Для получения статистически достоверных результатов группы формировались по принципу парных аналогов. Исследования выполнены с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, Франция, 1986).

Изучение эффективности лецитинового препарата проводили на экспериментальной модели острого гепатита у крыс, вызванного тетрахлорметаном, в соответствии с «Методическими указаниями по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ» (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, под общей редакцией Р. У. Хабриева, 2005). Острое токсическое поражение печени моделировали однократным внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода (CCl_4) в дозе 0,3 мг/кг массы тела.

Лабораторные крысы были разделены на три группы по 10 животных: 1-я – опытная, 2-я – позитивный контроль и 3-я – интактный контроль. Животным 1-й группы за час до введения гепатотоксиканта и в последующие 30 дней ежедневно вводили лецитиновый препарат *per os* в дозе 1 мл/кг массы тела животного; 2-я группа после затравки находилась без лечения; 3-я группа состояла из здоровых животных, получавших растительное масло в эквиваленте гепатопротектора по аналогичной схеме.

Эффективность гепатозащитного действия препарата оценивали по выживаемости лабораторных крыс, гравиметрическим показателям массы тела, клиническим признакам, а также степени изменения биохимических синдромов, наблюдающихся при поражении печени: цитолиза – по активности в сыворотке аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ); нарушения динамики желчи – по уровню в сыворотке крови щелочной фосфатазы (ЩФ), содержанию билирубина и холестерина.

Образцы крови для биохимического анализа отбирали у 5 животных из каждой группы через 15 сут от начала опыта и через сутки после последнего введения лецитиновой композиции. Лабораторные исследования проводили на биохимическом анализаторе Vitalab Flexor с помощью наборов фирмы ELITech Clinical Systems.

Объект исследований – гепатопротекторный препарат на основе рапсового лецитина, состав которого представлен в таблице 1.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов специальных программ, исследование количественных признаков – методом сравнения средних значений двух выборочных совокупностей с определением критерия Стьюдента и уровня значимости (*p*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что при введении крысам первых двух групп CCl_4 у животных 2-й группы (без лечения) уже на второй день эксперимента появились внешние признаки интоксикации: отказ от корма, угнетенное состояние, одышка, повышение температуры тела. На третий день была зафиксирована

Таблица 1
Содержание макро- и микронутриентов в рапсовом лецитине

| Показатель | Значение |
|---|----------|
| Фосфолипиды, г/100 г | 62,0 |
| в том числе фосфатидилхолины | 16,0 |
| фосфатидилэтаноламины | 15,5 |
| фосфатидилсерины | 9,5 |
| фосфатидные кислоты | 9,5 |
| фосфатидилинозитолы | 10,0 |
| дифосфатидилглицерины | 1,5 |
| Полиненасыщенные жирные кислоты, г/100 г | |
| линолевая C _{18:2} (омега-6) | 15,2 |
| линоленовая C _{18:3} (омега-3) | 3,1 |
| Соотношение жирных кислот омега-6 : омега-3 | 5:1 |
| Минеральные вещества, г/100 г | 6,81 |
| Токоферолы (витамин E), мг/100 г | 56,9 |
| в том числе α-токоферол | 14,0 |
| β+γ-токоферолы | 36,9 |
| δ-токоферол | 6,0 |
| Фитостерины, мг/100 г | 650 |
| в том числе β-ситостерол (провитамин D) | 445 |
| Макроэлементы, мг/100 г | |
| калий | 640 |
| магний | 400 |
| кальций | 710 |
| фосфор | 2380 |
| Микроэлементы, мг/100 г | |
| железо | 5,3 |
| медь | 0,2 |

Таблица 2
Влияние лецитина на динамику массы тела лабораторных крыс при экспериментальном гепатите (M ± m)

| Группа | Масса тела (г) | | |
|--|----------------|--------------|---------------|
| | Фон | Через 15 сут | Через 30 сут |
| 1-я опытная – CCl ₄ + лецитин | 205,8 ± 3,3 | 206,8 ± 2,4* | 229,5 ± 1,8** |
| 2-я опытная – CCl ₄ | 206,5 ± 2,4 | 199,2 ± 1,1 | 203,7 ± 2,9 |
| Контроль (интактные) | 204,7 ± 3,5 | 218,7 ± 4,2 | 231,0 ± 2,5 |

Различия достоверны (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,001) в сравнении с животными, получавшими CCl₄ без терапии.

гибель одной крысы. При этом у крыс 1-й опытной группы, дополнительно получавших лецитин, клинические проявления интоксикации были менее выражены и регистрировались позже – к 4-м сут эксперимента при 100%-й сохранности.

Гравиметрические исследования показали, что у крыс 2-й группы на протяжении всего эксперимента регистрировалась потеря массы тела, тогда как в группе с применением гепатопротектора к концу экспериментального периода вес животных хотя и не достиг показателей интактной группы, но фиксировался с положительной динамикой. При расчете процента прироста массы тела животных 1-й и 2-й групп разница составила 12,7% с высокой степенью достоверности (p ≤ 0,001) (табл. 2).

При биохимическом исследовании крови установлено, что при острой интоксикации четыреххлористым углеродом происходит значительное изменение показателей метаболического состояния гепатоцитов (табл. 3).

Введение животным CCl₄ вызвало выраженные изменения активности ферментов – маркеров функционального состояния печени. Во 2-й группе (без лечения) к середине опыта произошло достоверное увеличение активности АсАТ в 2,7 раза, а по завершении эксперимента разница с интактными животными составила 1,6 раза. Активность АлАТ увеличилась еще больше: на 15-е сут – в 3,7 раза и на 30-е сут – в 2 раза по сравнению с данными, полученными в контрольной группе крыс.

Активность АсАТ у животных 1-й группы, получавших лецитиновый препарат, к середине опыта была ниже значений этого же показателя во 2-й группе на 32,2% (p ≤ 0,01), а к концу – на 38,7% (p ≤ 0,001), но при этом превысила значения, полученные в контрольной группе. В содержании АлАТ прослеживалась аналогичная динамика: разница на 15-е сут наблюдений составила 32,3% (p ≤ 0,001), а на 30-е – 37,7% (p ≤ 0,01) относительно крыс 2-й группы, но значение показателя оставалось выше, чем у интактных животных.

По показателям желчеобразования у всех животных опытных групп была зарегистрирована гипербилирубинемия, причем концентрация общего билирубина в крови животных группы без лечения к концу эксперимента превысила показатели крыс 1-й группы в 1,9 раза. Уровень щелочной фосфатазы во 2-й группе к концу наблюдений вырос в 1,89 раза, а в 1-й – только на 10,9%. Подобная картина свидетельствует о наличии холестатического синдрома, вызванного нарушением желчевыделительной функции печени и поражением желчных канальцев (внутрипеченочный холестаз).

Введение CCl₄ обусловило нарушение протеинсинтетической функции печени, что подтвердилось снижением содержания общего белка у животных 2-й группы на 13,2% по отношению к здоровым крысам. Применение лецитиновых фосфолипидов позволило минимизировать развитие обменных нарушений. Разница между 1-й и 2-й группами составила 3,1%.

Полученные результаты биохимических исследований сыворотки крови крыс позволяют констатировать, что при интоксикации животных CCl₄ происходит повышение активности аминотрансфераз, свидетельствующее о повреждении мембран гепатоцитов, а также гибели клеток печени под действием гепатотоксиканта,

Таблица 3

Влияние лецитина на биохимические показатели крови лабораторных крыс при экспериментальном гепатите ($M \pm m; n = 5$)

| Показатель | 1-я опытная CCl ₄ + лецитин | | 2-я опытная CCl ₄ | | Контроль (интактные) | |
|---------------------------|---|----------------|---------------------------------|---------------|-------------------------|--------------|
| | Сутки после интоксикации | | | | | |
| | 15 | 30 | 15 | 30 | 15 | 30 |
| Общий белок, г/л | 88,5 ± 3,25* | 81,4 ± 2,28** | 93,3 ± 3,06 | 74,1 ± 3,83 | 82,4 ± 1,92 | 83,9 ± 2,11 |
| Мочевина, мм/л | 6,83 ± 0,27 | 7,12 ± 0,17* | 6,64 ± 0,32 | 3,82 ± 0,41 | 7,25 ± 0,55 | 7,38 ± 0,37 |
| АсАТ, ЕД/л | 194,9 ± 7,6** | 125,7 ± 6,1*** | 257,6 ± 5,8 | 174,3 ± 7,6 | 95,5 ± 3,5 | 106,4 ± 5,0 |
| АлАТ, ЕД/л | 158,4 ± 4,2*** | 90,8 ± 3,9** | 209,6 ± 8,9 | 125,0 ± 6,2 | 57,3 ± 4,8 | 63,5 ± 3,9 |
| ЩФ, ЕД/л | 703,9 ± 17,0* | 648,5 ± 9,7* | 711,0 ± 16,4 | 1107,2 ± 25,3 | 576,5 ± 13,5 | 585,0 ± 17,0 |
| Холестерин, мм/л | 2,13 ± 0,22** | 1,25 ± 0,13** | 7,83 ± 0,09 | 5,45 ± 0,18 | 1,53 ± 0,03 | 1,48 ± 0,02 |
| Общий билирубин, мкМ/л | 20,7 ± 3,5*** | 16,3 ± 2,7*** | 43,7 ± 4,3 | 30,9 ± 2,9 | 9,4 ± 1,2 | 10,5 ± 0,9 |

Различия достоверны (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) в сравнении с животными, получавшими CCl₄ без терапии.

что приводит к выходу внутриклеточных субстанций в кровь и лимфу. Данный процесс сопровождается внутрипеченочным холестазом и нарушением протективной функции печени. Применение лецитиновых фосфолипидов улучшает параметры биохимических констант гомеостаза и функционального состояния печени подопытных крыс на фоне токсического поражения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, резюмируя результаты изучения эффективности лецитина при экспериментальном поражении печени лабораторных животных, можно утверждать, что он обладает выраженными гепатопротективными свойствами, способствующими снижению общего токсического, цитолитического и холестатического проявлений повреждающего действия токсиканта.

Полученные данные могут послужить основанием для применения рапсовых лецитинов в качестве перспективных гепатопротекторов природного происхождения с возможностью их использования как биологически активных добавок или действующих начал лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний печени у животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ипатова О. М. Фосфолипиды: механизм действия и применение в клинике: дис. ... д-ра биол. наук // М.: Изд-во ГУ НИИ биомед. химии РАМН, 2005. – 319 с.
- Корнен Н. Н., Викторова Е. П., Евдокимова О. В. Методологические подходы к созданию продуктов здорового питания // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84, № 1. – С. 95–99.
- Кунц Э., Гундерманн К.-Й, Шнайдер Э. «Эссенциальные» фосфолипиды в гепатологии (экспериментальный и клинический опыт) // Терапевтический архив. – 1994. – № 2. – С. 660–672.
- Никитин И. Г. Гепатопротекторы: мифы и реальные возможности // Фарматека. – 2007. – № 13. – С. 14–18.
- Огай М. А., Степанова Э. Ф., Малявина В. В. Использование лецитина в мягких лекарственных формах // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – № 22 (117), вып. 16/2. – С. 159–163.
- Семененко М. П., Кузьминова Е. В., Фомин О. А. Новые подходы к лабораторной диагностике болезней печени у высокопродуктивного молочного скота // Ветеринария Кубани. – 2014. – № 3. – С. 11–13.
- Molecules of medium mass as an integral indicator of endogenous intoxication in the diagnosis of hepatopathy and its effect on improving the economic efficiency of veterinary measures in the field of dairy farming / M. P. Semenenko, E. V. Kuzminova, E. V. Tyapkina [et al.] // J. Pharm. Sci. & Res. – 2017. – Vol. 9, No. 9. – P. 1573–1575.

О ПРОВЕДЕНИИ

ФГБУ «ВНИИЗЖ» МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПТИЦ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ»

С 15 по 16 февраля 2018 г. под эгидой подведомственного Россельхознадзору федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» состоялась Международная научно-практическая конференция ветеринарных врачей птицефабрик Российской Федерации и стран СНГ «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных заболеваний птиц в промышленном птицеводстве», в рамках которой был рассмотрен ряд вопросов по обеспечению ветеринарного благополучия птицефабрик.

Мероприятие отмечено высокой степенью важности ввиду глобальной угрозы распространения в РФ и за ее пределами особо опасных и экономически значимых болезней птиц, в частности высокопатогенного гриппа.

В работе конференции приняли участие ведущие специалисты и представители птицефабрик, фермерских хозяйств и областных станций по борьбе с болезнями животных и птиц из регионов РФ и ближнего зарубежья.

Специалисты ФГБУ «ВНИИЗЖ» ознакомили собравшихся с достижениями и опытом работы Центра, уделив особое внимание его деятельности по защите промышленного птицеводства от особо опасных болезней и контролю качества выпускаемых биопрепаратов.

На семинаре была озвучена глобальная эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц; рассмотрена клиника, способы борьбы и профилактики особо опасных болезней птиц, таких как грипп птиц, ньюкаслская болезнь, инфекционный бронхит кур, болезнь Гамборо, болезнь Марек, инфекционный ларинготрахеит птиц, гемофилез кур, а также аденовирусные инфекции птиц.

Большое внимание в рамках встречи было уделено рассмотрению критериев благоприятных условий содержания птицы, соблюдению технологии выращивания и ветеринарно-санитарных требований, качественному проведению лечебно-профилактических мероприятий, позволяющих не только получать высокие показатели продуктивности, но и обеспечивать ветеринарное благополучие хозяйства.

Специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ» была представлена подробная информация о разработке и про-

изводстве вакцин для профилактики болезней птиц на базе Центра, а также стандартизации лекарственных средств и контроле качества препаратов производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Кроме того, обстоятельно рассказано о возможностях Испытательного центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» по оказанию услуг для птицефабрик и контролю качества птицеводческой продукции.

В этом году в работе мероприятия участвовали и международные лекторы. В частности, слушатели смогли узнать об эпизоотической ситуации по болезням птиц в Таджикистане и стратегии профилактики.

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

К деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» был проявлен особый интерес со стороны региональной прессы. Представителей СМИ интересовала ситуация по инфекционным болезням птиц во Владимирской области и стране в целом, а также распространение гриппа птиц как угроза российской экономике. Директор ФГБУ «ВНИИЗЖ» Дмитрий Лозовой отметил в своем интервью, что ситуация с гриппом птиц во Владимирской области находится под контролем, и подчеркнул, что обстановка в других регионах может отличаться значительно. Препятствиями для распространения болезни являются высокий уровень биозащиты птицефабрик закрытого типа, профилактическая вакцинация птиц в частных подворьях граждан в наиболее уязвимых по заносу регионам и, конечно, существующая система мониторинга, направленная на раннее обнаружение заболевания, что позволяет оперативно ликвидировать первичные очаги инфекции. Что касается ущерба, причиняемого гриппом птиц, то Дмитрий Лозовой объяснил, что помимо экономической составляющей он имеет и социальные, экологические аспекты, может быть прямым и косвенным, ввиду чего сложно поддается расчету. Кроме того, директор ФГБУ «ВНИИЗЖ» рассказал о научных достижениях в части уникальных исследований в области гриппа птиц на базе учреждения и о деятельности Испытательного центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» по оказанию услуг для птицефабрик и контролю качества продукции. Также в ходе интервью он коснулся вопроса об электронной ветеринарной сертификации, призванной обеспечить пищевую и биологическую безопасность страны.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

- Редакция «Ветеринарии сегодня» (http://www.arriah.ru/main/veterinary_today/about) рассмотрит возможность 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 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 6–8 страниц (до 10 страниц – для обзора) – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы).

Предоставление в редакцию рукописи статей является подтверждением согласия автора на использование его произведения как в бумажном, так и в электронном виде. Авторы несут ответственность за полноту и достоверность цитируемой в их работах литературы, а также за публикацию заимствованного материала без ссылки на источник. Материалы направляются в редакцию с сопроводительным письмом от организации автора (форма на сайте).

СТРУКТУРА ПРЕДСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ

1. УДК.
2. Название статьи.
3. Имя, отчество, фамилия автора.
4. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты.
5. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков.
6. Ключевые слова (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
7. Введение.
8. Материалы и методы.
9. Результаты и обсуждение.
10. Выводы или заключение.
11. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи). Формат оформления в соответствии с ГОСТ Р 7.05-2008. Не более 5–7 источников.
12. К размещению принимаются иллюстрированные материалы (фото, картинки) 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).

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

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

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

ПОДРОБНЕЕ ОБ УСЛОВИЯХ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

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

Телефон: +7 (4922) 26-15-12, 26-17-65, 26-19-88, доб. 22-27

Контактное лицо: Лаврухина Ольга Игоревна, телефон: +7 (905) 611-26-77, e-mail: lavruhina@arriah.ru

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



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

ПРЕИМУЩЕСТВА ВИРУСВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИББ ЖИВОЙ СУХОЙ «ГАМБОРОМИКС»

В ноябре 2017 г. Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору был зарегистрирован новый препарат производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» – «Вирусвакцина против инфекционной бурсальной болезни живая сухая «Гамборомикс», номер регистрационного удостоверения 12-1-15.17-3946№ПВР-1-15.17/03402.

Основу препарата составляет комбинация штаммов болезни Гамборо «Винтерфилд 2512» и «БГ», позиционируемых как «промежуточный» и «горячий» варианты соответственно.

Лекарственная форма вакцины – лиофилизат для приготовления суспензии для перорального применения. Вакцина изготовлена из экстраэмбриональной жидкости, гомогената тушек и хориоаллантоисных оболочек СПФ-эмбрионов кур, инфицированных вирусом инфекционной бурсальной болезни указанных штаммов, с добавлением стабилизирующих компонентов (% по объему): гидролизата лактальбумина (5%), сахарозы (5%) и модифицированной желатозы (0,5%). Препарат производят согласно регламенту по производству и контролю вирусвакцины против инфекционной бурсальной болезни живой сухой «Гамборомикс», утвержденному в ФГБУ «ВНИИЗЖ». Качество вирусвакцины оценивают согласно СТО 00495527-0279-2017.



«Вирусвакцина против инфекционной бурсальной болезни «Гамборомикс» по основным характеристикам соответствует требованиям, изложенным в Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017.

Препарат предназначен для профилактики ИББ в благополучных, угрожаемых, а также неблагополучных хозяйствах различного направления выращивания с субклинической формой болезни. Вирусвакцина индуцирует иммунитет к возбудителю болезни Гамборо через 14–21 сутки.

Вирусвакцина «Гамборомикс» сочетает в себе положительные свойства использованных штаммов вируса ИББ, а именно иммунологическую инвазивность по отношению к трансвариальному иммунитету и низкую реактогенность.

Препарат «Гамборомикс» по антигенному действию продемонстрировал признаки синергического эффекта составляющих штаммов. Для достижения протективного иммунитета комбинация штаммов требует меньшего количества вакцинного вируса, чем известные моновакцины, при этом динамика иммунного ответа сохраняется. Это, очевидно, является важным преимуществом данной вирусвакцины.

По результатам доклинических и клинических исследований вирусвакцина «Гамборомикс» является безвредным и иммуногенным препаратом.

**По вопросам приобретения ветеринарных препаратов производства
ФГБУ «ВНИИЗЖ» необходимо обращаться по телефонам:
8 (4922) 26-02-90, (4922) 26-15-25**