



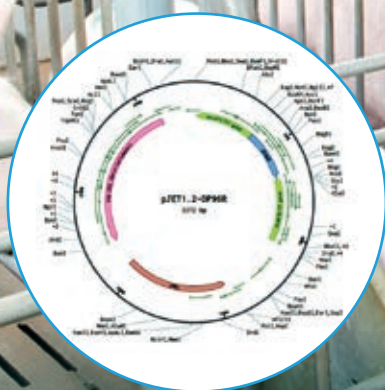
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY SCIENCE TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



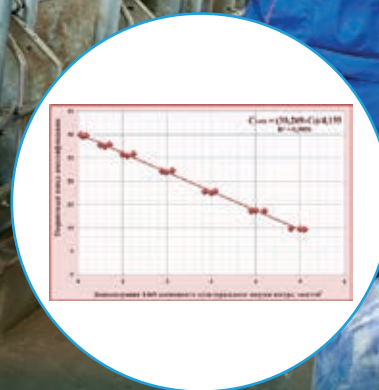
**КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ,
КОДИРУЮЩИХ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ
БЕЛКИ И БЕЛКИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ
ЗА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВИРУСА
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**
с. 3

**CLONING OF GENES ENCODING
TRANSMEMBRANE PROTEINS
AND PROTEINS RESPONSIBLE FOR
AFRICAN SWINE FEVER VIRUS
VIRULENCE**
p. 8



**ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ
АКТИВНОСТИ АССОЦИИРОВАННЫХ
ВАКЦИН ПРОТИВ БОЛЕЗНИ
АУЕСКИ, РЕПРОДУКТИВНО-
РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА
И ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
СВИНЕЙ**
с. 13

**TESTING OF COMBINED VACCINES
AGAINST AUJEZSKY'S DISEASE,
PORCINE REPRODUCTIVE
AND RESPIRATORY SYNDROME
AND PORCINE PARVOVIRUS
INFECTION FOR THEIR ANTIGENICITY**
p. 13



**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОНЦЕНТРАЦИИ 146S КОМПОНЕНТА
ВИРУСА ЯЩУРА В СЫРЬЕ
ДЛЯ ВАКЦИНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ
МЕТОДА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ
И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ**
с. 26

**METHOD OF DETERMINATION
OF THE CONCENTRATION OF FMD
VIRUS 146S COMPONENT IN VACCINE
RAW MATERIALS USING REAL-
TIME REVERSE TRANSCRIPTION –
POLYMERASE CHAIN REACTION**
p. 31

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

The journal's mission is the delivery of information on basic development trends of veterinary science and practice and highlighting of vital issues and innovative developments in veterinary area for scientific community



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

Editor-in-Chief:

Dmitry A. Lozovoy — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Director of the FGBI "ARRIAH", Vladimir
Tel/fax: 8 (4922) 26-15-73, e-mail: lozovoy@arriah.ru

Editorial Director: Julia Melano

Executive Editors: Olga Lavrukina, Victoria Mishina
e-mail: vet_today@arriah.ru, lavruhina@arriah.ru; 8 (4922) 26-15-12, ext. 22-27

Редакционный совет журнала «Ветеринария сегодня»:

Болдбаатар Базарцэрэн — доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. 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 ВНИИБП, г. Щелково, Россия

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

Кузьмина Е. В. — доктор ветеринарных наук, Краснодарский НИВИ — обособленное структурное подразделение ФГБНУ КНЦЗВ, г. Краснодар, Россия

Ломако Ю. В. — кандидат ветеринарных наук, доцент, РУП ИЗВ им. С. Н. Вышелецкого, г. Минск, 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 университет 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

Федотов С. В. — доктор ветеринарных наук, профессор, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия

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

Эрдэнэбаатар Жанчивдорж — доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

Editorial council:

Boldbaatar Bazartseren — PhD/DVM, Leading Researcher, Laboratory Head, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Buchatsky L. P. — Doctor of Science (Biology), Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Grin S. A. — Doctor of Science (Biology), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Schelkovo, Russia

Zaberezhny A. D. — Doctor of Science (Biology), Professor, All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine n. a. Ya. R. Kovalenko, Moscow, Russia

Kuzminova Ye. V. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar RIVM — economically autonomous structural subdivision of FGBNU KRCZVM, Krasnodar, Russia

Lomako Yu. V. — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Research RUE Institute of the Experimental Veterinary Medicine of S. N. Vyshelsky, Minsk, Belarus

Mischenko N. V. — Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Vladimir State University n. a. A. G. and N. G. Stoletovs, Vladimir, Russia

Nedosekov V. V. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Savchenkova I. P. — Doctor of Science (Biology), Professor, FGBRI All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine n. a. Ya. R. Kovalenko, Moscow, Russia

Sokolovic M. — PhD/DVM, Professor, Deputy Laboratory Head/Deputy QM, CVI-Poultry Centre, Zagreb, Croatia

Suleymanov S. M. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Voronezh State Agrarian University n. a. Peter the First, Voronezh, Russia

Fedotov S. V. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Chernov A. N. — Doctor of Science (Biology), FGBRI Federal Centre for Toxicological, Radiological and Biological Safety, Kazan, Russia

Erdenebaatar Janchivdorj — PhD/DVM, Professor, Leading Researcher, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Дизайн и верстка: Мария Бондарь
Корректор: Анжелла Дзасохова

Design and composition: Maria Bondar
Proof-reader: Anzhella Dzasokhova

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

The Journal "Veterinary Science Today" is registered in the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media Federal Service, Registration Certificate No FS77-47033, March 21, 2012.

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

Scientific Journal "Veterinary Science Today" is included in the information analysis system — Russian Science Citation Index (RSCI). Full-text e-versions of the Journal are published on the website of the Scientific Electronic Library, eLIBRARY.RU. Registered trademark, certificate No 514190

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»: Editorial Board:



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

Vasilyevich F. I. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, President of the K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow



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

Vlasov N. A. — Doctor of Science (Biology), Professor, Deputy Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, Moscow



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

Gruzdev K. N. — Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Gulyukin M. I. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honorary Scientist of the Russian Federation, FGRI All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary Medicine n. a. Ya. R. Kovalenko, Moscow



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

Igolkin A. S. — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Reference Laboratory, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Isayeva G. S. — Doctor of Science (Philosophy), Candidate of Science (Agriculture), Vice-Minister of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan



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

Irza V. N. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Expert, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Krasochko P. A. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Doctor of Science (Biology), Professor, Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus



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

Makarov V. V. — Doctor of Science (Biology), Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, RUDN, Moscow



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

Metlin A. Ye. — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research and Development, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Mischenko V. A. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Expert, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Plyusnikov V. G. — Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Director of Agrarian and Technological Institute, RUDN, Moscow



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

Prokhvatilova L. B. — Candidate of Science (Biology), Associate Professor, Head of the Department for Research Coordination, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Pruntova O. V. — Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Russaleyev V. S. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Scientific Secretary, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Samuilenko A. Ya. — Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBNU VNITIBP, Schelkovo



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

Sisyagin P. N. — Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBNU NIVI NC Russia, Nizhny Novgorod



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

Starov S. K. — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Deputy Director for Quality, FGBI "ARRIAH", (Deputy Editor-in-Chief), Vladimir



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

Subbotin A. M. — Doctor of Science (Biology), Professor, Aide to Belarus President — Vitebsk Oblast Inspector, Minsk, Belarus



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

Shakhov A. G. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, RAS Associate Member, GNU VNIIPIPAT RAAS, Voronezh

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. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Circulation: 2000. Price: unregulated.

Establisher: FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH")

Publisher: ООО "Da Vinci Media", 121069, Moscow, Povarskaya st., 31/29, Facility VI, Room 13

Editorial Board Office: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"

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

Подписано в печать 26 июня 2018 года
Дата выхода 29.06.2018

Printing Office: ООО "Union Print", 603022, Nizhny Novgorod Oblast, Nizhny Novgorod, Oksky S'ezd, 2, tel: (831) 439-44-99

Approved for print 26 June 2018
Issued: 29.06.2018

СОДЕРЖАНИЕ

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

3 Али Мазлум, Н. Г. Зиняков, А. С. Иголкин, Н. Н. Власова
КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ
БЕЛКИ И БЕЛКИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВИРУСА
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

13 Е. П. Баборенко, Е. К. Долганова, К. Н. Груздев
ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ АССОЦИИРОВАННЫХ ВАКЦИН
ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ, РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО
СИНДРОМА И ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

18 А. С. Оганесян, М. А. Шибаяев, Н. Е. Баскакова, Ф. И. Коренной, А. К. Караулов
ЭПИЗООТИЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ 2007–2017 ГГ.
ЧАСТЬ 1. ОБЩИЕ ТРЕНДЫ АЧС НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ЕВРАЗИИ

ЯЩУР

26 М. И. Доронин, А. М. Тимина, Д. А. Лозовой, В. А. Стариков,
Д. В. Михалишин, Н. Н. Медведева, А. В. Борисов
СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ 146S КОМПОНЕНТА ВИРУСА
ЯЩУРА В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ОБРАТНОЙ
ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

36 В. М. Гуленкин, А. К. Караулов, Д. А. Лозовой, В. М. Захаров
ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА РИСКА ЗАНОСА ЯЩУРА НА ТЕРРИТОРИЮ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ИЗ НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ГОСУДАРСТВ

БОЛЕЗНИ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

42 А. В. Константинов, С. К. Старов, В. И. Диев, Н. В. Мороз, Е. В. Курненькова,
Д. К. Басова, А. В. Кононов, К. Ю. Федосеев
АНТИГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
АССОЦИИРОВАННОЙ ВИРУСВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ ОВЕЦ И ОСПЫ КОЗ

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

47 М. Н. Гусева, М. А. Шевченко, Д. С. Большаков, М. И. Доронин,
Д. В. Михалишин, А. А. Шишкова, В. В. Михалишин
ИЗМЕНЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СЕЗОНА ЗАГОТОВКИ СЫРЬЯ

53 Т. В. Кручинкина, Ю. А. Гаврилов, Г. А. Гаврилова
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО
ЙОДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА «ВАНГЦЕЙОД»

57 Э. Р. Рафикова
ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ВЕТОМ 21.77» НА БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ
СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ

61 И. В. Сердюченко, Н. Н. Гугушвили
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ТКАНЯХ ОРГАНОВ ПЧЕЛ
КАК ПОКАЗАТЕЛЯ УРОВНЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

64 Е. О. Анисимова, В. В. Пронин, Л. В. Клетикова, Н. Н. Якименко
ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
КРОВИ УТОК ПЕКИНСКОЙ ПОРОДЫ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ
СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

CONTENTS

PORCINE DISEASES

8 Ali Mazloum, N. G. Zinyakov, A. S. Igolkin, N. N. Vlasova
CLONING OF GENES ENCODING TRANSMEMBRANE PROTEINS
AND PROTEINS RESPONSIBLE FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS VIRULENCE

13 Ye. P. Baborenko, Ye. K. Dolganova, K. N. Gruzdev
TESTING OF COMBINED VACCINES AGAINST AUJEZSKY'S DISEASE,
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME AND PORCINE
PARVOVIRUS INFECTION FOR THEIR ANTIGENICITY

18 A. S. Oganasyan, M. A. Shibayev, H. Ye. Baskakova,
F. I. Korennoy, A. K. Karaulov
AFRICAN SWINE FEVER EPIDEMIC IN 2007–2017
PART 1. COMMON TRENDS FOR ASF IN THE RUSSIAN FEDERATION
AND IN EURASIA

FOOT-AND-MOUTH DISEASE

31 M. I. Doronin, A. M. Timina, D. A. Lozovoy, V. A. Starikov,
D. V. Mikhailishin, N. N. Medvedeva, A. V. Borisov
METHOD OF DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF FMD VIRUS
146S COMPONENT IN VACCINE RAW MATERIALS USING REAL-TIME
REVERSE TRANSCRIPTION – POLYMERASE CHAIN REACTION

36 V.M. Gulenkin, A. K. Karaulov, D.A. Lozovoy, V.M. Zakharov
EXPERT RISK ASSESSMENT OF FMD INTRODUCTION TO THE RUSSIAN
FEDERATION FROM INFECTED COUNTRIES

SMALL RUMINANTS DISEASES

42 A. V. Konstantinov, S. K. Starov, V. I. Diev, N. V. Moroz, E. V. Kurnenkova,
D. K. Basova, A. V. Kononov, K. Yu. Fedoseyev
ANTIGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF EXPERIMENTAL ASSOCIATED
VIRUS VACCINE AGAINST SHEEP POX AND GOAT POX

GENERAL ISSUES

47 M. N. Guseva, M. A. Shevchenko, D. S. Bolshakov, M. I. Doronin,
D. V. Mikhailishin, A. A. Shishkova, V. V. Mikhailishin
CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION OF BLOOD PROTEIN HYDROLYSATE
DEPENDING ON THE RAW MATERIAL PREPARATION MATERIAL

53 T. V. Kruchinkina, Yu. A. Gavrilov, G. A. Gavrilova
TOXICOLOGIC CHARACTERISTICS OF THE PREVENTIVE IODINE-CONTAINING
PREPARATION “VANGTSEYOD”

57 E. R. Rafikova
EFFECT OF “VETOM 21.77” PREPARATION
ON SERUM BIOCHEMICAL PATTERN IN MICE

61 I. V. Serduchenko, N. N. Gugushvili
DETERMINATION OF GLYCOGEN IN BEE ORGAN TISSUES
AS AN ENERGY METABOLISM PARAMETER

64 Ye. O. Anisimova, V. V. Pronin, L. V. Kletikova, N. N. Yakimenko
DYNAMICS OF HAEMATOLOGICAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS
OF PEKIN DUCK BLOOD DURING ADMINISTRATION
OF ORGANIC SELENIUM PREPARATION

ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ПРИСВОЕН НОВЫЙ СТАТУС РЕФЕРЕНТНОЙ ЛАБОРАТОРИИ МЭБ

В ходе последней ежегодной Генеральной сессии в Париже Всемирная ассамблея делегатов МЭБ утвердила статус ФГБУ «Федеральный центр здоровья животных» как новой «Референтной лаборатории МЭБ по высокопатогенному и низкопатогенному гриппу птиц и ньюкаслской болезни».



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ PORCINE DISEASES

УДК 619:578.842.1:612.015.348:575.113

DOI 10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ И БЕЛКИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Али Мазлум¹, Н. Г. Зиняков², А. С. Иголкин³, Н. Н. Власова⁴

¹ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ali.mazloun6@gmail.com

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

³ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

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

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты клонирования генов Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R изолята Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней и анализ их нуклеотидных последовательностей. Полученные клоны дополнили ранее созданную клонотеку, содержащую клоны с 8 генами изолята Krasnodar 06/12. Клоны, содержащие гены Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R изолята Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней, будут использованы для получения рекомбинантных белков и изучения их влияния на репродукцию вируса *in vitro*, их роли в инфекционности вируса, степени выраженности клинических признаков и вирулентности. В работе использовали прокариотический вектор рJET1.2/blunt. Таким образом, имеющаяся в референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ» клонотека дополнена плазмидными конструкциями рJET1.2-Х69R, рJET1.2-А179L, рJET1.2-Е248R, рJET1.2-I215L и рJET1.2-DP96R, несущими 5 генов изолята Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней. Доля клонированных генов вируса составила 3,01% генома изолята Krasnodar 07/17, следовательно, общий объем клонотеки достиг 7,82%.

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), трансмембранные белки, белки, ответственные за вирулентность вируса АЧС, секвенирование, клонотека генов.

ВВЕДЕНИЕ

Создание репрезентативных клонотек ДНК-последовательностей является эффективным подходом в разработке современных диагностических средств и рекомбинантных вакцин. Кроме того, использование клонотек при анализе структуры генов возбудителей особо опасных болезней исключает использование инфекционного агента, уменьшая опасность работы для исследователя.

Клонотека (библиотека) генов представлена набором рекомбинантных плазмид (или их содержащих клонов бактериальных клеток), несущих различные гены определенного хозяина. Первая клонотека генов была создана в 1977 г. F. Sanger и соавт. [11, 12].

S. D. Kollnberger и соавт. в 2002 г. провели скрининг библиотеки экспрессирующих генов вируса африканской чумы свиней (АЧС) с помощью поликлональной антисыворотки (от свиней, выживших после инфици-

рования вирулентным вирусом АЧС) и идентифицировали 14 серологических иммунодетерминант, включая неструктурные белки рВ602L, рС44L, рСР312R, рЕ183L, рК145R и рК205R, структурные белки рА104R, р10/рК78R, р30/рСР204L, р54/рЕ183L, р72/рВ646L, а также вирусные ферменты: рибонуклеотидредуктазу (рР334L, рР778R), ДНК-лигазу (рНР419L) и тимидинкиназу (рК169R) [9].

В 2014 г. впервые в Российской Федерации была создана клонотека генов СР204L, КР177R, О61R, ЕР402R, СР530R, Е183L и фрагментов генов В646L, СР2475L вируса АЧС изолята Krasnodar 06/12, клонированных в составе векторной молекулы рJET 1.2. Доля клонированных генов вируса АЧС составляла 4,81% генома изолята Krasnodar 03/12 [2]. В состав данной библиотеки не входили гены Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R, кодирующие белки рХ69R, рА179L, рЕ248R, убиквитин-конъюгирующий фермент (Е2) и UK соответственно. Эти гены играют важную роль в поддержании вирулентности возбудителя АЧС и влияют на степень выраженности клинических признаков.

Установлено, что для образования полноценных инфекционных вирионов вируса АЧС необходим белок рЕ248R, кодируемый геном Е248R, расположенным в левой концевой вариационной области генома вируса. Он обладает характеристиками, аналогичными белку р54, и локализуется на внутренней липопротеидной оболочке вирусной частицы [5].

Белок рА179L/5HL, или р21 (вирусный гомолог Bcl2 (vBcl2)), кодируется геном А179L, расположенным в центральной консервативной области генома вируса АЧС, имеет молекулярную массу 19 кДа и блокирует процесс апоптоза в инфицированной клетке [6, 10]. Функция этого белка установлена при экспрессии в гетерологичных системах, таких как вирус осповакцины или бакуловирус [4]. Данный белок синтезируется как на ранней, так и на поздней стадии инфекции, таким образом подтверждая свою решающую роль в выживании клеток на различных этапах жизненного цикла вируса АЧС.

Белок UK с молекулярной массой 10,7 кДа, состоящий из 96 аминокислот, кодируется геном DP96R, расположенным в правом вариационном конце генома. При анализе нуклеотидных последовательностей гена DP96R, представленных в генетических базах данных, значительного сходства между DP96R и другими генами известных вирусов не обнаружено. Известно, что этот ген ответственен за вирулентность вируса АЧС и степень выраженности клинических признаков. В результате проведенных экспериментов все животные выжили после заражения генетически модифицированным вирусом, лишенным гена DP96R [3].

Убиквитин-конъюгирующий фермент (Е2), кодируемый геном I215L, гомологичен семейству белков, связывающих убиквитин в инфицированной клетке [15]. Процесс начинается со связывания убиквитина с белками для дальнейшей модификации, в этом процессе действуют три фермента: Е1, Е2 и Е3. Фермент Е2 взаимодействует с ферментом Е1 и одним или несколькими Е3, чтобы регулировать их активность, также он может взаимодействовать непосредственно с белками и играть роль в определении путей их модификации, опосредованных убиквитином [7].

Состоящий из 69 аминокислот белок рХ69R кодируется неохарактеризованным в настоящий момент геном Х69R. Однако анализ с помощью программы Vaxign для прогнозирования уровня антигенности белков показал, что Х69R кодирует трансмембранный структурный белок, обладающий способностью эффективно индуцировать выработку антител. Оценка уровня антигенности белков, проведенная для вируса АЧС, отнесла его лишь на 22-ю позицию в качестве кандидата на использование при разработке вакцины [8, 16, 17]. Вследствие чего клонотека, включающая копии данных генов, может быть использована при разработке рекомбинантных и ДНК-вакцин против АЧС или генетически модифицированного вируса. Данный факт обусловил выбор направления работ по пополнению репрезентативной библиотеки клонов генов вируса АЧС.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантных плазмид, несущих полноразмерные гены трансмембранных белков и белков, ответственных за вирулентность вируса африканской чумы свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для клонирования выбрали изолят Krasnodar 07/17 вируса АЧС, выделенный из пробы селезенки от павшей домашней свиньи (июль 2017 г., Краснодарский край, ООО «АПК «Петровский»). Патологический материал использовали для заражения культуры клеток селезенки свиней. Вирусосодержащую суспензию второго пассажа использовали для выделения ДНК.

Выделение вирусной ДНК осуществляли с помощью набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя [11].

Учет результатов полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили методом электрофоретического разделения в 1,0%-м агарозном геле с детектированием в УФ-свете после окраски бромистым этидием. Для определения длины фрагментов использовали 1 к маркер (Thermo Fisher) с линейкой фрагментов от 250 до 10 000 п.о.

Для проведения секвенирования выделяли ПЦР-продукт из агарозного геля с помощью набора реагентов для элюции ДНК из агарозных гелей (Qiagen) согласно инструкции [14].

Клонирование ПЦР-продуктов проводили согласно руководству CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher) в векторе рJET1.2/blunt с использованием клеток *E. coli* штамма JM109 [13].

Полученные ампликоны секвенировали с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit на капиллярном ДНК-секвенаторе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Для анализа нуклеотидных последовательностей генома штаммов и изолятов вируса АЧС использовали

Рис. 1. Схема полноразмерного генома вируса АЧС штамма Georgia 2007/1 с расположением ОРС генов Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R

Стрелками указано направление рамки считывания клонированных генов, а в скобках отмечены позиции их локализации. Синим цветом выделены гены с ориентацией в обратном направлении (L), а красным цветом – с ориентацией в прямом направлении (R).



Таблица
Праймеры, использованные для амплификации генов вируса АЧС

Название гена	Позиция в геноме	Направление рамки считывания	Праймеры	Позиции праймеров	Размер фрагмента (п.о.)
E248R	166992–167738	Слева направо	E248R-F	166983 167008	759
			E248R-R	167721 167742	
I215L	173792–174430	Справа налево	I215L-F	173754 173778	717
			I215L-R	174449 174471	
DP96R	184331–184621	Слева направо	DP96R-F	184314 184334	404
			DP96R-R	183698 184718	
A179L	53779–54318	Справа налево	A179L-U	53748 53767	679
			A179L-D	54408 54427	
X69R	19227–19436	Слева направо	X69R-F	18470 18493	1140
			X69R-R	19586 19610	

ресурсы международных баз данных NCBI, EMBL. Сравнительный анализ гомологии нуклеотидных последовательностей генов проводили с помощью программ BioEdit (версия 7.2.5) и Benchling.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа по получению клонов генов вируса АЧС и анализу их нуклеотидных последовательностей включала в себя несколько этапов.

1. Дизайн праймеров

На основе изучения литературы и проведенного анализа расположения генов X69R, A179L, E248R, I215L и DP96R на физической карте генома изолята Georgia 2007/1 вируса АЧС (рис. 1) определили оптимальные участки для дизайна праймеров.

С помощью программы Benchling рассчитали 5 пар праймеров, фланкирующих полноразмерные перечисленные гены (табл.).

2. Оптимизация условий постановки ПЦР

Температуру отжига праймеров подбирали, используя для постановки реакции градиент температур от 42 до 62 °С с шагом 1 °С на амплификаторе Mastercycler nexus (Eppendorf, Германия). В результате экспериментов оптимизировали условия амплификации фрагментов генома вируса для клонирования. Установили, что оптимальные температуры отжига праймеров находятся в диапазоне 50–55 °С.

3. Клонирование генов вируса АЧС в векторе pJET1.2/blunt

Амплифицированные полноразмерные копии генов (рис. 2) использовали для конструирования рекомбинантных плазмид на основе прокариотического вектора pJET1.2 с последующей трансфекцией полученных конструкций в клетки *E. coli*.

Лигирование встройки с вектором проводили по типу концев. В среднем для проведения одной реакции лигирования ПЦР-продуктов размером более 1000 п.о. использовали от 50 до 100 нг/μл ДНК и 25 нг/μл вектора pJET1.2/blunt, для ПЦР-продуктов менее 1000 п.о. – от 20 до 50 нг/μл ДНК и 25 нг/μл вектора pJET1.2/blunt.

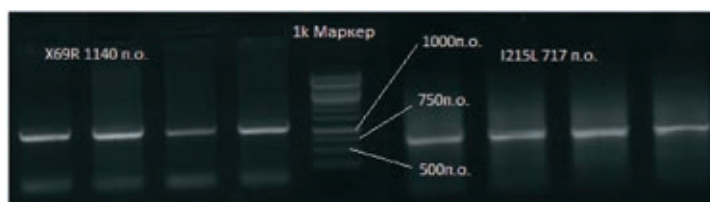
Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* штамма JM109 в концентрации 10^6 в 50 мкл.

Выбор прокариотического вектора pJET1.2/blunt для клонирования ПЦР-продуктов обусловлен удобством и простотой манипуляций, поскольку методика не требует проведения очистки ПЦР-продуктов от компонентов реакционной смеси. Кроме того, применение данного вектора позволяет провести клонирование с возможностью получения до 100% положительных клонов, избавляя от необходимости проведения скрининга колоний.

Плазмидную ДНК полученных клонов анализировали в ПЦР на наличие встроек и использовали для

Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения в 1%-м геле агарозы ПЦР-продуктов (изолят Krasnodar 07/17 вируса АЧС)

Слева от маркера полосы ПЦР-продуктов при использовании праймеров для амплификации фрагментов, содержащих ген X69R, а справа от маркера – фрагментов, содержащих ген I215L.



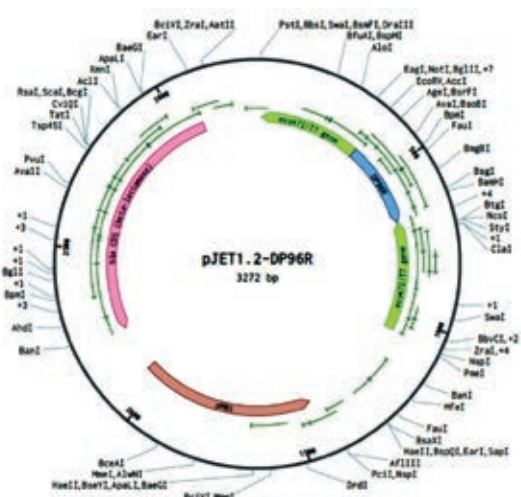


Рис. 5. Схема рекомбинантной плазмиды рJET1.2, несущей ген DP96R вируса АЧС

Голубая стрелка – встройка клонированного гена;

зеленая стрелка – полилинкер плазмиды pJET1.2;

розовая стрелка – ген β -лактамазы.

В центре – название и размер рекомбинантной плазмиды.

и др. [2]. Доля клонированных генов вируса АЧС составила 3,01% генома изолята Krasnodar 07/17, следовательно, общий объем клонотеки достиг 7,82%.

Выбор генов вируса АЧС, представленных в работе, проводился из двух групп: гены (Х69R и Е248R), кодирующие трансмембранные белки, и гены (А179L, DР96R и I215L), кодирующие белки, влияющие на вирулентность вируса и степень выраженности клинических признаков АЧС.

Клонотека первой группы генов предназначена для переклонирования в экспрессирующие плазмиды и получения рекомбинантных белков с целью изучения их влияния на репродукцию вируса и установления их роли в этом процессе. Клонотека второй группы может быть использована для получения генетически модифицированного вируса и проведения сравнительного анализа его репродукции, как первый этап в разработке вакцины против вируса АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобранные олигонуклеотидные праймеры позволили амплифицировать полноразмерные гены Х69R, А179L, Е248R, I215L и DP96R вируса АЧС, кодирующие трансмембранные белки и белки, влияющие на вирулентность вируса, а также определить их нуклеотидные последовательности для изолята Krasnodar 07/17.

Получены рекомбинантные плазмидные конструкции, несущие амплифицированные полноразмерные гены.

Плазмидные конструкции рJET1.2-X69R, рJET1.2-A179L, рJET1.2-E248R, рJET1.2-I215L и рJET1.2-DP96R, входящие в состав представленной в данной работе клонотеки, будут использованы для получения рекомбинантных белков и изучения их влияния на репродукцию вируса АЧС *in vitro*. Кроме того, они могут быть использованы для определения особенностей структуры отдельных генов, создания альтернативных источников генетического материала, как положительный

контроль в ПЦР-диагностике, а также для получения рекомбинантных вирусов и ДНК-вакцин против АЧС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». – URL: http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/ff0/Инструкция%20ДНК-сорб-В_30.10.2012.pdf.
2. Конструирование библиотеки генов, кодирующих иммуногенно значимые белки вируса АЧС изолята Krasnodar 06/12 / А. А. Варенцова, И. В. Шевченко, Н. Г. Зиняков [и др.] // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. – № 5–1. – С. 28–35.
3. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine / L. Zsak, E. Caler. Z. Lu [et al.] // J. Virol. – 1998. – Vol. 72, No. 2. – P. 1028–1035.
4. African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death / A. Brun, C. Rivas, M. Esteban [et al.] // Virology. – 1996. – Vol. 225, No. 1. – P. 227–230.
5. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites / J. M. Rodríguez, R. García-Escudero, M. L. Salas, G. Andrés // J. Virol. – 2004. – Vol. 78, No. 8. – P. 4299–4313. DOI: 10.1128/JVI.78.8.4299–4313.2004.
6. An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1 / J. G. Neilan, Z. Lu, C. L. Afonso [et al.] // J. Virol. – 1993. – Vol. 67, No. 7. – P. 4391–4394.
7. E2 enzymes: More than just middlemen / M. D. Stewart, T. Ritterhoff, R. E. Klevit, P. S. Brzovic // Cell Res. – 2016. – Vol. 26, No. 4. – P. 423–440. DOI: 10.1038/cr.2016.35.
8. He Y., Xiang Z., Mobley H. L. T. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development // J. Biomed. Biotechnol. – Vol. 2010. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/297505>.
9. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody / S. D. Kollnberger, B. Gutierrez-Castañeda, M. Foster-Cuevas [et al.] // J. Gen. Virol. – 2002. – Vol. 83. – P. 1331–1342.
10. Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus bcl-2 homologue: role of the BH1 domain / Y. Revilla, A. Cebrían, E. Baixeras [et al.] // Virology. – 1997. – Vol. 228, No. 2. – P. 400–404.
11. Menon R., Farina C. Shared molecular and functional frameworks among five complex human disorders: a comparative study on interactomes linked to susceptibility genes // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (4):e18660. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018660>.
12. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA / F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell [et al.] // Nature. – 1977. – Vol. 265, No. 5596. – P. 687–695.
13. Product Information Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. – URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012966_CloneJET_PCR_Cloning_40rxn_UG.pdf.
14. QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. – URL: http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf.
15. Rodríguez J. M., Salas M. L., Viñuela E. Genes homologous to ubiquitin-conjugating proteins and eukaryotic transcription factor SII in African swine fever virus // Virology. – 1992. – Vol. 186, No. 1. – P. 40–52.
16. Safety and immunogenicity of mammalian cell-derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine / J. Lopera-Madrid, J. E. Osorio, Y. He [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2017. – Vol. 185. – P. 20–33. DOI: 10.1016/j.vetimm.2017.01.004.
17. Xiang Z., He Y. Genome-wide prediction of vaccine targets for human herpes simplex viruses using Vaxign reverse vaccinology // BMC Bioinformatics. – 2013. – Vol. 14 (Suppl 4):S2. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/S4/S2>.

Поступила 24.03.18

Принята в печать 27.04.18

CLONING OF GENES ENCODING TRANSMEMBRANE PROTEINS AND PROTEINS RESPONSIBLE FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS VIRULENCE

Ali Mazloun¹, N. G. Zinyakov², A. S. Igolkin³, N. N. Vlasova⁴

¹ PhD Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ali.mazloun6@gmail.com

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

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

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

SUMMARY

Results of cloning X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R genes of ASF virus Krasnodar 07/17 isolate and analysis of their nucleotide sequences are presented. Obtained clones were added to the previously constructed clone library comprising clones of 8 genes of Krasnodar 06/12 isolate. Clones containing X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R genes of ASF virus Krasnodar 07/17 isolate will be used for recombinant protein obtaining and testing for their effect on *in vitro* virus reproduction and their role in the virus infectivity, level of clinical manifestations and virulence. Prokaryotic vector, pJET1.2/blunt, was used. Thus, the clone library available at the FGBI "ARRIAH" Reference Laboratory for African swine fever was supplemented by pJET1.2-X69R, pJET1.2-A179L, pJET1.2-E248R, pJET1.2-I215L and pJET1.2-DP96R plasmid constructions containing 5 genes of ASF virus Krasnodar 07/17 isolate. Proportion of cloned virus genes was 3.01% of Krasnodar 07/17 isolate genome, hence, total amount of the clone library has reached 7.82%.

Key words: African swine fever (ASF), transmembrane proteins, proteins responsible for ASF virus virulence, sequencing, gene clone library.

INTRODUCTION

Construction of representative DNA clone libraries is an efficient approach to the development of up-to-date diagnostic tools and recombinant vaccines. Moreover, use of clone libraries for the genetic analysis of highly dangerous disease agents allows to avoid the use of the infectious agent thus mitigating danger for the researcher.

The gene clone library is represented by the selection of recombinant plasmids (or bacterial cell clones comprising them) bearing different genes of specific host. The first gene clone library was constructed by F. Sanger et al. in 1977 [11, 12].

In 2002, S. D. Kollnberger et al. screened the library of expressing genes of African swine fever virus (ASFV) using polyclonal antisera (from pigs recovered from the infection with virulent ASFV) and identified 14 serological immunodeterminants including non-structural proteins (pB602L, pC44L, pCP312R, pE183L, pK145R and pK205R), structural proteins (pA104R, p10/pK78R, p30/pCP204L, p54/pE183L, p72/pB646L) and the following viral enzymes: ribonucleotide reductase (pF334L, pF778R), DNA ligase (pNP419L) and thymidine kinase (pK169R) [9].

In 2014, in the Russian Federation the first library of clones of CP204L, KP177R, O61R, EP402R, CP530R, E183L genes and B646L CP2475L gene fragment of ASFV Krasnodar 06/12 isolate was constructed. The genes and gene fragments were cloned within pJET 1.2. vector molecule. The proportion of cloned ASFV genes amounted to 4.81% of Krasnodar 06/12 isolate genome [2]. This library did not include X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R genes, coding pX69R, pA179L, pE248R, ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and UK proteins, respectively. These genes play an important role in the maintenance of ASF agent virulence and effect the degree of disease clinical manifestation.

Protein pE248R coded by gene E248R located in the left terminal variable region of the virus genome was demonstrated to be essential for the formation of viable infectious ASFV virions. It is specified by the properties similar to p54 protein and it is localized on the inner lipoprotein membrane of the virus particle [5].

Protein pA179L/5HL or p21 (viral homologue of Bcl2 (vBcl2)) is coded by A179L gene located in the cen-

Georgia 2007/1 (189344 bp)



Fig. 1. Layout of full-size genome of ASFV Georgia 2007/1 strain with location of ORF of X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R genes

The arrows designate the direction of the gene open reading frame; the location is designated in brackets. Upstream genes (L) are designated in blue; downstream genes are designated in red (R).

tral conserved region of the ASFV genome. It has molecular weight of 19 kDa and blocks apoptosis of infected cells [6, 10]. The function of this protein was demonstrated during the expression in heterologous systems such as vaccinia virus or baculovirus [4]. This protein is synthesized both at the early and late stages of the infection thus supporting its critical role in the cell survival at different stages of the ASFV life cycle.

UK protein of 10.7 kDa molecular weight consists of 96 amino acids and is coded by DP96R gene located at the right variable terminus of the genome. Analysis of DP96R nucleotide sequences deposited in gene databases did not demonstrate any significant similarity between DP96R and other genes of known viruses. It is well known that this gene is responsible for ASFV virulence and degree of clinical manifestation. All experimental animals recovered following the infection with genetically modified DP96R-free virus [3].

Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) coded by I215L gene is homologous to the protein family that bind ubiquitin in the infected cell [15]. The process starts with ubiquitin binding with the proteins for its further modification: three proteins (E1, E2 and E3) are involved in the process. Enzyme E2 interacts with enzyme E1 and one or several E3 enzymes for their activity regulation; it can also interact directly with the proteins and play its role in determination of their ubiquitin-mediated modification route [7].

69-amino-acid pX69R protein is coded by a currently non-described X69R genome. However, protein antigenicity prognostic analysis using Vaxign system demonstrated that X69R codes the trans-membrane structural protein having an ability to effectively induce the antibody production. Assessment of the ASFV protein antigenicity level classified the virus as only the 22nd in the line of candidates to be used for the vaccine design [8, 16, 17]. Therefore, the clone library including copies of these genes can be used for the development of recombinant and DNA-vaccines against ASF or for the production of genetically modified virus. This fact determined the orientation of the works to the replenishment of the representative ASFV gene clone library.

The work was also aimed at the production of recombinant plasmids bearing full-size genes of transboundary proteins and proteins responsible for African swine fever virus virulence.

MATERIALS AND METHODS

ASFV Krasnodar 07/17 isolate recovered from pig spleen sample (July 2017, Krasnodar Krai, OOO APK Petrovsky) was selected for cloning. The pathological material

was used for the infection of the pig spleen cell culture. The second passage virus-containing suspension was used for DNA extraction.

The viral DNA was extracted using DNA-sorb-B test-kit (FBUN Central Research Institute of Epidemiology, Rosпотребнадзор, Russia) according to the manufacturer's instruction [1].

Polymerase chain reaction (PCR) results were read using 1.0% agarose gel electrophoresis with subsequent UV detection following staining with ethidium bromide. The fragment length was determined using 1kb DNA ladder (Thermo Fisher) for the range of 250-10000 bp.

For sequencing, the PCR-products were extracted from the agarose gel using gel extraction test-kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions [14].

The PCR-products were cloned according to CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher) manual using pJET1.2/blunt cloning vector and *E. coli* JM-109 strain [13].

The obtained amplicons were sequenced using Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit with ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (DNA-sequencer) (Applied Biosystems, USA).

Genome nucleotide sequences of ASFV strains and isolates were analyzed using data from international databases such as NCBI and EMBL. BioEdit version 7.2.5 and Benchling software were used for the comparison of the nucleotide sequence homology.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of ASFV genes and analysis of their nucleotide sequences included several stages:

1. Primer design

Optimal sites for primer design were defined basing on the publications and analysis of X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R on the Georgia 2007/1 ASFV genome physical map (Fig. 1).

Using Benchling software five primer pairs that flanked the above listed full-size genes were calculated (see the Table).

2. PCR optimization

Primer annealing temperature was adjusted using Mastercycler-nexus amplifier (Eppendorf, Germany) at 42–62 °C gradient range with 1 °C increase. The experiments resulted in optimization of conditions of the virus genome fragments' amplification for their further cloning. The optimal annealing temperatures are established to be within 50–55 °C.

3. Cloning of ASFV genes in pJET1.2/blunt vector

The amplified full-size gene copies (Fig. 2) were used for construction of prokaryotic pJET1.2-vectored recombinant

Table
Primers used for ASFV gene amplification

Gene name	Position in the genome	ORF direction	Primers	Primers' positions	Fragment size (bp)
E248R	166992–167738	From left to right	E248R-F	166983 167008	759
			E248R-R	167721 167742	
I215L	173792–174430	From right to left	I215L-F	173754 173778	717
			I215L-R	174449 174471	
DP96R	184331–184621	From left to right	DP96R-F	184314 184334	404
			DP96R-R	183698 184718	
A179L	53779–54318	From right to left	A179L-U	53748 53767	679
			A179L-D	54408 54427	
X69R	19227–19436	From left to right	X69R-F	18470 18493	1140
			X69R-R	19586 19610	

plasmids with subsequent *E. coli* transfection with the produced constructions.

Vector-containing insertions were ligated by blunt ends. Averagely, 50–100 ng of DNA and 25 ng/ml of pJET1.2/blunt vector were used for ligation of PCR products of over 1000 bp; in case of PCR products of below 1000 bp – 20–50 ng/ml of DNA and 25 ng/ml of pJET1.2/blunt vector were used.

For transformation competent cells of *E. coli* JM109 strain were used at $10^6/50\mu\text{l}$.

Prokaryotic vector pJET1.2/blunt was chosen for PCR-product cloning due to the convenience and simplicity of its handling, as this method does not require PCR-product purification from the reaction mixture components. Use of this vector furthermore allows cloning with

100% positive clone availability thus avoiding colony screening.

Plasmid DNA of the produced clones was PCR tested for insertions and was used for further sequencing. For this purpose, three clones bearing homologous insertion of each gene were selected. Analysis of the nucleotide sequences of the cloned PCR-products confirmed that full-size genes were cloned in pJET1.2/blunt plasmid.

4. Nucleotide sequencing of ASFV genome

Since determining the gene orientation within the cloning plasmid is an essential requirement for its subsequent recloning into expressing plasmids, primers flanking the polylinker-region of pJET1.2/blunt plasmid were used during sequencing. This allowed determination of the cloned gene orientation. The analysis results dem-

Fig. 2. Results of PCR-product electrophoretic separation in 1% agarose gel (ASFV Krasnodar 07/17 isolate)

To the left of the marker – PCR-product obtained using primers for amplification of genome fragments containing X69R gene; to the right of the marker – fragments containing I215L gene.



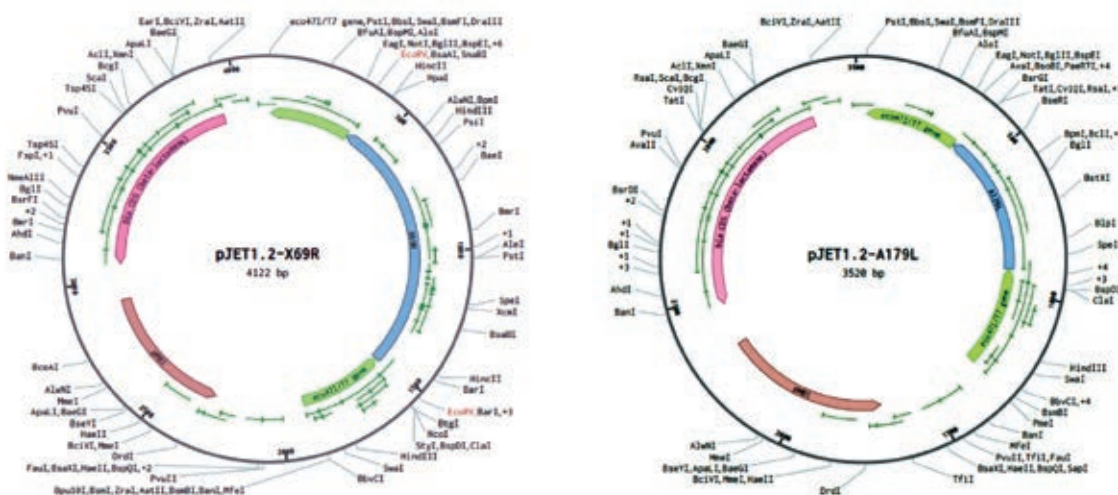


Fig. 3. Diagram of recombinant pJET1.2 plasmid bearing ASFV genes X69R (left) and A179L (right)

Blue arrow – cloned gene insertion; green arrow – pJET1.2 plasmid polylinker;
pink arrow – β-lactamase gene. The recombinant plasmid name and size are in the center.

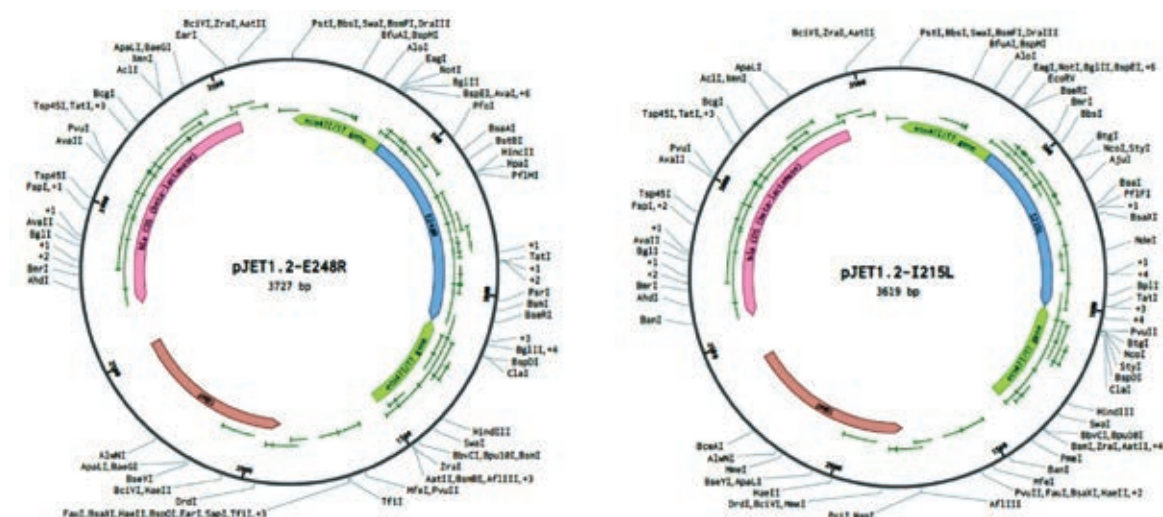


Fig. 4. Diagram of recombinant pJET1.2 plasmid bearing ASFV genes E248R (left) and I215L (right)

Blue arrow – cloned gene insertion; green arrow – pJET1.2 plasmid polylinker; pink arrow – β-lactamase gene.
The recombinant plasmid name and size are in the center.

onstrated that A179L and X69R genes were cloned in reverse orientation and E248R, I215L and DP96R genes – in direct orientation.

Full-size nucleotide sequences of X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R genes of Krasnodar 07/17 isolate were also analyzed. The results demonstrated that they were identical to the similar sequences of Georgia 2007/1 isolate.

Thus as a result of the work performed five ASFV genes were produced in the recombinant plasmids: pJET1.2-X69R bearing 1140 bp insertion, and pJET1.2-A179L bearing 679 bp insertion (Fig. 3); pJET1.2-E248R bearing 759 bp insertion and pJET1.2-I215L bearing 717 bp insertion (Fig. 4); pJET1.2-DP96R bearing 404 bp insertion (Fig. 5).

The obtained clones were added to the clone library containing 8 genes coding immunologically relevant ASFV proteins (B646L (p72), CP204L (p30), KP177R (p22), O61R (p12), EP402R (CD2v), CP530R (pp62),

CP2475L (pp220) and E183L (p54)) and established in 2014 by A. A. Varentsova, et al. [2]. The portion of cloned ASFV genes amounted to 3.01% of the genome of Krasnodar 07/17 isolate; thus overall volume of the library reached 7.82%.

The ASFV genes described in the paper were selected from two groups: transmembrane protein-coding genes (X69R and E248R), and genes (A179L, DP96R and I215L) coding proteins affecting ASF virus virulence and degree of clinical manifestation.

The clone library of the first group of the genes is intended for the recloning to expressing plasmids and production of recombinant proteins for examination of their effect on the virus reproduction and for determination of their role in this process. The clone library of the second group of the genes can be used for production of genetically modified virus and its comparison analysis thus being the first stage of the ASFV vaccine development.

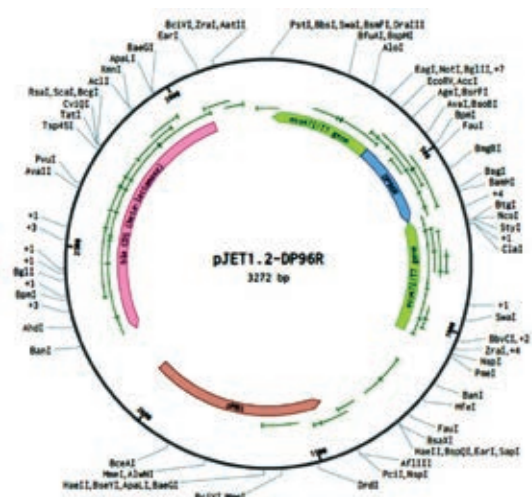


Fig. 5. Diagram of recombinant pJET1.2 plasmid bearing ASFV gene DP96R

Blue arrow – cloned gene insertion;

green arrow – pJET1.2 plasmid polylinker;

pink arrow – β -lactamase gene.

The recombinant plasmid name and size are in the center.

CONCLUSION

The selected oligonucleotide primers allowed for amplification of the ASFV full-size genes X69R, A179L, E248R, I215L and DP96R that code transmembrane proteins and proteins affecting the virus virulence and for determination of their nucleotide sequences for Krasnodar 07/17 isolate.

Recombinant plasmid constructions bearing amplified full-size genes were produced.

Plasmid constructions pJET1.2-X69R, pJET1.2-A179L, pJET1.2-E248R, pJET1.2-I215L and pJET1.2-DP96R included in the above described clone library will be used for production of recombinant proteins and examination of their effect on ASFV reproduction *in vitro*. Furthermore, they can be used for determination of specific structural properties of individual genes, development of alternative sources of the genetic material, production of recombinant viruses and DNA vaccines against ASF and as positive controls in PCR-diagnosis.

REFERENCES

1. Instruction for use of AmpliPrime-DNA-Sorb-B nucleic acid extraction kit [Instrukcija po primenjeniju komplekta reagentov dlja jekstrakcii DNK iz klinicheskogo materiala «AmpliPrajm DNK-sorb-V»]. – URL: http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/ff0/Инструкция%20ДНК-сорб-В_30.10.2012.pdf (in Russian).
2. Varentsova A. A., Shevchenko I. V., Zinyakov N. G. et al. Construction of library of genes encoding immunologically significant proteins of ASF virus Krasnodar 06/12 isolate [Konstruirovaniye biblioteki genov, kodirujushhih immunologicheski znachimye belki virusa AChS izolzata Krasnodar 06/12]. *Current*

aspects of humanities and the sciences. 2014; 5–1: 28–35 (in Russian).

3. Zsak L., Caler E., Lu Z. et al. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J. Virol.* 1998; 72 (2): 1028–1035.

4. Brun A., Rivas C., Esteban M. et al. African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology*. 1996; 225 (1): 227–230.

5. Rodríguez J. M., García-Escudero R., Salas M. L., Andrés G. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J. Virol.* 2004; 78 (8): 4299–4313. DOI: 10.1128/JVI.78.8.4299–4313.2004.

6. Neilan J. G., Lu Z., Afonso C. L. et al. An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *J. Virol.* 1993; 67 (7): 4391–4394.

7. Stewart M. D., Ritterhoff T., Klevit R. E., Brzovic P. S. E2 enzymes: More than just middlemen. *Cell Res.* 2016; 26 (4): 423–440. DOI: 10.1038/cr.2016.35.

8. He Y., Xiang Z., Mobley H. L. T. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J. Biomed. Biotechnol.* Vol. 2010. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/297505>.

9. Kollnberger S. D., Gutierrez-Castañeda B., Foster-Cuevas M. et al. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J. Gen. Virol.* 2002; 83: 1331–1342.

10. Revilla Y., Cebrián A., Baixeras E. et al. Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology*. 1997; 228 (2): 400–404.

11. Menon R., Farina C. Shared molecular and functional frameworks among five complex human disorders: a comparative study on interactomes linked to susceptibility genes. *PLoS ONE*. 2011; 6 (4):e18660. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018660>.

12. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977; 265 (5596): 687–695.

13. Product Information Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. – URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012966_CloneJET_PCR_Cloning_40rxn_UG.pdf.

14. QIAquick Gel Extraction Kit Protocol. – URL: http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf.

15. Rodríguez J. M., Salas M. L., Viñuela E. Genes homologous to ubiquitin-conjugating proteins and eukaryotic transcription factor SII in African swine fever virus. *Virology*. 1992; 186 (1): 40–52.

16. Lopera-Madrid J., Osorio J. E., He Y. et al. Safety and immunogenicity of mammalian cell-derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2017; 185: 20–33. DOI: 10.1016/j.vetimm.2017.01.004.

17. Xiang Z., He Y. Genome-wide prediction of vaccine targets for human herpes simplex viruses using Vaxign reverse vaccinology. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14 (Suppl 4):S2. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/S4/S2>.

Submitted 24.03.18

Approved for publication 27.04.18

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ АССОЦИИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ, РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА И ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Е. П. Баборенко¹, Е. К. Долганова², К. Н. Груздев³

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: baborenko@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия

³ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: gruzdev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены исследования по изучению антигенных свойств вакцины против болезни Ауески из маркированного штамма, репродуктивно-респираторного синдрома свиней инактивированной эмульгированной, вакцины против болезни Ауески из маркированного штамма и парвовирусной инфекции свиней инактивированной эмульгированной производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Показано, что биопрепараты могут успешно использоваться в целях профилактики репродуктивно-респираторного комплекса заболеваний, парвовирусной инфекции свиней и болезни Ауески. Особую значимость они приобретают при использовании в программах по контролю и искоренению болезни Ауески. Применение вакцин из маркированного штамма вируса болезни Ауески дает возможность дифференцировать животных, имеющих в сыворотках крови антигены к маркированному вакцинному штамму (по отсутствию антител к гликопротеину gE в 100% случаев), от животных с антителами к полевым штаммам вируса болезни Ауески. Комплексная оценка применения ассоциированных вакцин, разработанных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» (болезнь Ауески из маркированного штамма, репродуктивно-респираторный синдром, парвовирусная инфекция), в системе противоэпизоотических мероприятий в одном из свиноводческих хозяйств Российской Федерации показала их безвредность, высокую антигенную активность, иммуногенность.

Ключевые слова: болезнь Ауески, маркированный штамм, репродуктивно-респираторный синдром свиней, парвовирусная инфекция свиней, антигенность.

UDC 619:616.98:578:6.4:615.371

TESTING OF COMBINED VACCINES AGAINST AUJEZSKY'S DISEASE, PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME AND PORCINE PARVOVIRUS INFECTION FOR THEIR ANTIGENICITY

Ye. P. Baborenko¹, Ye. K. Dolganova², K. N. Gruzdev³

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: baborenko@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia

³ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: gruzdev@arriah.ru

SUMMARY

Tests of inactivated emulsion anti-Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine based on marker Aujeszky's disease virus strain, PRRS virus strain and inactivated emulsion anti-Aujeszky's disease and porcine parvovirus infection vaccine based on marker Aujeszky's disease virus strain and porcine parvovirus strain developed by the FGBI "ARRIAH" for their antigenicity are described in the paper. It is demonstrated that the said vaccines can be used successfully for PRRS and porcine parvovirus infection and Aujeszky's disease prevention. They are becoming of special significance when used in programs on Aujeszky's disease control and eradication. The use of the vaccine based on marker Aujeszky's disease virus strain allows differentiation between the animals that have antibodies to the marker vaccine strain (in the absence of antibodies to the glycoprotein gE in 100% of cases) from the animals with antibodies to field strains of the Aujeszky's disease virus in their sera. A comprehensive assessment of the use of associated vaccines developed in the FGBI "ARRIAH" (against Aujeszky's disease based on the marker strain, reproductive and respiratory syndrome, parvovirus infection), in the framework of anti-epidemic measures on a pig farm of the Russian Federation showed their safety, high antigenicity, immunogenicity.

Key words: Aujeszky's disease, marker virus strain, porcine reproductive and respiratory syndrome, porcine parvovirus infection, antigenicity.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные респираторные болезни свиней – одна из важнейших проблем ветеринарии. Они широко распространены практически во всех странах мира с развитым свиноводством и причиняют большой экономический ущерб. В современной зарубежной и отечественной литературе инфекционные болезни органов дыхания свиней рассматриваются как респираторный симптомокомплекс свиней. Возраст, при котором это комплексное заболевание имеет место, сильно варьирует. В США респираторный симптомокомплекс у свиней в основном наблюдают в возрасте от 14 до 20 нед. В странах ЕС данная проблема часто возникает на этапе доращивания (8–10 нед) или на раннем этапе откорма (10–15 нед). В России инфекционные болезни с поражением системы органов дыхания наблюдают начиная с 35-х сут жизни поросят и в период откорма. В большинстве случаев они протекают как ассоциированная (смешанная) инфекция [4].

Вирусные респираторные патогены подразделяют на несколько групп. В первую группу входят основные, или первичные, патогены, вызывающие поражения легких. К этой группе, как правило, относят вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, цирковир свиней 2-го типа (ЦВС-2), вирус гриппа свиней, вирус болезни Ауески. Вторая группа включает вирусы, играющие второстепенную роль в патологии респираторного тракта, но влияющие на репродуктивность; в эту группу входят парвовирус, парамиксовирус, аденовирус, реовирус и др. [2].

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) – высококонтагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся поздними абортами, преждевременными родами, рождением нежизнеспособных, мумифицированных и уродливых поросят, гибелью поросят в течение первых дней жизни, прохлостами свиноматок и поражением органов дыхания. Уровень мертворождаемости и инфицирования поросят в помете зависит прежде всего от вирулентности изолята вируса и срока супоросности, на котором свиноматка подверглась заражению. Мертворождаемость может составлять от 0 до 100%, процент инфицирования приплода варьирует в пределах от 4 до 75% и составляет в среднем 45%. Отличительной особенностью РРСС является то, что это заболевание часто протекает в ассоциации с другими инфекциями (болезнь Ауески, парвовирусная и энтеровирусная инфекции, энцефаломиокардит, грипп, лептоспироз и др.) [3, 4]. На территории России РРСС регистрируется ежегодно. По данным ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», в 2015–2016 гг. отмечались вспышки РРСС в Центральном (Липецкая область), Северо-Западном (Мурманская область), Сибирском (Алтайский край и Омская область), Дальневосточном (Приморский край) федеральных округах.

Болезнь Ауески (БА) – вирусная инфекционная болезнь свиней, которые являются естественными хозяевами возбудителя, хотя вирус БА может поражать крупный рогатый скот, овец, кошек, собак и крыс, вызывая смертельную болезнь. Под термином «свинья» подразумевают все виды *Sus scrofa* – как домашних, так и диких свиней. БА вызывается герпесвирусом и характеризуется абортными у свиноматок, поражением центральной нервной системы у поросят, респираторным синдромом у поросят-отъемышей. Как правило, БА у животных протекает в острой форме. Инкубацион-

ный период длится от 2 до 15 сут, иногда дольше. Восприимчивость к возбудителю зависит от патогенных свойств штамма вируса, возраста животного, а также воздействия стрессовых факторов. Переболевшие свиньи становятся латентными вирусоносителями в течение всей жизни животных. Вирус БА реплицируется в альвеолярных макрофагах и моноцитах и часто ассоциируется с некротическим ринитом и трахеитом. Однако при наличии вируса РРСС, ЦВС-2, парвовируса, вируса гриппа свиней БА может приобретать более тяжелое течение, главным образом у поросят на доращивании и первого периода откорма, осложняясь бактериальной микрофлорой. Такие эпизоотологические особенности БА делают это заболевание одним из экономически значимых для промышленного свиноводства. Россия стационарно неблагополучна по БА. По объемам вакцинации свиней, проводимой в РФ, иммунизация против БА на 4-м месте после классической чумы свиней, рожи и сальмонеллеза.

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) – контагиозная вирусная болезнь, клинически проявляющаяся только у супоросных свиноматок нарушением функции органов воспроизводства, прохлостами, малоплодием, гибелью эмбрионов, рождением малоплодных пометов, мумифицированных плодов, мертвых и слабых поросят и, реже, абортными. У хряков-производителей заболевание протекает субклинически. В настоящее время ПВИС зарегистрирована в 32 странах мира [5, 6]. Анализ серологических данных, проводимый в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА), подтверждает циркуляцию ПВИС в свиноводческих хозяйствах РФ.

Из перечисленных выше болезней свиней БА является обязательной для нотификации во Всемирную организацию здравоохранения животных (МЭБ). По ней определяют статус благополучия страны или зоны по БА при проведении торговых операций [1, 7]. В соответствии со статьей 8.2.4 Кодекса здоровья наземных животных [1] страна или зона может быть признана благополучной по болезни Ауески, если она не обнаруживалась минимум 25 лет или если минимум 10 лет в этой стране или зоне проводятся мероприятия при соблюдении целого набора требований. Страна или зона может быть также признана благополучной по БА при условии, что вакцинация домашних и содержащихся в неволе диких свиней против БА запрещена в стране или зоне минимум два года, кроме случаев, когда используется способ дифференциации иммунных и зараженных свиней, валидированный по стандартам МЭБ.

В нашей стране одним из основных звеньев в комплексе ветеринарно-санитарных мероприятий по борьбе против вышеуказанных заболеваний является использование вакцин, обладающих способностью вызывать у свиней выработку стойкого и длительного иммунитета. Наиболее массово для вакцинации против БА на протяжении многих лет используют традиционную вакцину из штамма «ВГНКИ». Препарат выпускается разными отечественными производителями, характеризуется относительно низкой ценой и достаточной эффективностью. Но применение таких вакцин не позволяет достичь статуса благополучия страны или зоны по БА, так как специфические антитела вырабатываются в организме свиней на полноценный вирион возбудителя и их трудно отличить от постинфекционных антител.

Для восстановления статуса благополучия страны или зоны по БА допускается проводить профилактическую иммунизацию свиней против БА вакцинами, приготовленными из делетированных по gE штаммов вируса БА (маркированная вакцина). Данное положение МЭБ дает возможность свиноводческим хозяйствам промышленного типа повысить экспортные возможности в отношении своей продукции в условиях неблагополучия страны по БА посредством применения маркированной вакцины.

С этой целью в ФГБУ «ВНИИЗЖ» разработаны и выпускаются для использования в ветеринарной практике ассоциированные эмульгированные вакцины с использованием штаммов вирусов, выделенных на территории Российской Федерации против РРСС (европейского генотипа), ПВИС, а также маркированного штамма вируса БА. Основным преимуществом инактивированных вакцин является их эпизоотологическая безопасность, которая заключается в отсутствии возможности горизонтальной и вертикальной передачи вакцинного штамма вируса. С учетом этого данные вакцины могут применяться для иммунизации репродуктивного поголовья и поросят как в благополучных хозяйствах, так и в угрожаемых районах. Они обладают высоким спектром биологической, антигенной и иммуногенной активности, способны вызывать напряженный и длительный иммунитет у привитых животных.

На начальном этапе искоренения БА в странах Евросоюза применялись как маркированные моновакцины против БА, так и в ассоциации с вакцинациями против РРСС и ПВИС. Для создания наиболее напряженного иммунитета в ряде стран рекомендуют схему вакцинации против БА, включающую иммунизацию свиноматок инактивированными препаратами, а полученный от них молодняк – живыми вакцинами.

Целью данной работы являлась оценка антигенных свойств вышеуказанных биопрепаратов, включающих маркированный штамм вируса БА, после применения в свиноводческих хозяйствах РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцины:

– против болезни Ауески из маркированного штамма и парвовирусной инфекции свиней инактивированная эмульгированная. Вакцина изготовлена из маркированного gE-негативного штамма «ВК» вируса болезни Ауески и штамма «ВЛ-94» парвовируса свиней, выращенных на перевиваемых культурах клеток яичников домашней козы и почки поросенка, инактивированных аминоэтилэтиленимином с добавлением масляного адъюванта до 70% от объема препарата;

– против болезни Ауески из маркированного штамма и репродуктивно-респираторного синдрома свиней инактивированная эмульгированная. Вакцина изготовлена из маркированного gE-негативного штамма «ВК» вируса болезни Ауески и штамма «КПР-96» вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), выращенных на перевиваемых культурах клеток яичников домашней козы и почки макаки-резуса, которая является трофовариантом клеточной культуры МА-104, инактивированных аминоэтилэтиленимином с добавлением 70% адъюванта.

Животные. В опытах использовали клинически здоровых поросят в возрасте двух месяцев живой массой 20–25 кг, полученных из благополучных по БА, РРСС

и ПВИС хозяйств, кроликов массой 2,5–3,0 кг, белых мышей.

Для дифференциального исследования сывороток крови свиней на наличие специфических антител против вируса БА использовали наборы «HerdChek PPV gB Antibody Test Kit» и «HerdChek PPV gI Antibody Test Kit» (IDEXX, USA), против вируса РРСС – набор «Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit» (IDEXX, USA), против ПВИС – «Набор препаратов для серодиагностики ПВИС в РТГА» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Учет результатов проводили согласно инструкциям по применению наборов.

Изучение эффективности предлагаемых биопрепаратов проводили в свиноводческих хозяйствах. Вакцины применяли согласно инструкции по применению.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью проверки реактогенности разработанных биопрепаратов каждый образец испытуемых вакцин вводили внутримышечно 10 белым мышам, 6 кроликам и 2 подсвинкам в дозе 0,5; 2,0 и 5,0 см³ соответственно. За клиническим состоянием животных вели наблюдение в течение 14 сут, результаты наружного осмотра оценивали по проявлению припухлости в месте введения вакцины. Существенного отклонения общего и местного характера не выявлено. У кроликов отмечалось незначительное местное повышение температуры тела и образование припухлости диаметром около 1 см в месте введения вакцины. Эти признаки полностью исчезали к концу срока наблюдения. При внутримышечном введении препарата поросятам в дозе, двукратно превышающей рекомендуемую (согласно международным требованиям к оценке безвредности инактивированных вакцин), только у отдельных животных имело место кратковременное повышение температуры тела на 0,7 °С, а также образование незначительной припухлости на месте инъекции, исчезающей через 3–4 сут. По истечении срока наблюдения животных подвергали вынужден-

Таблица 1

Антигенная активность вакцины против БА из маркированного штамма и РРСС инактивированной эмульгированной

n = 15

Группа животных	Уровень антител		
	РРСС	БА	
		gE	gB
До вакцинации	15/0* 0,15 ± 0,02**	15/0 0,95 ± 0,02	15/0 0,91 ± 0,02
21-е сут после вакцинации	15/11 0,42 ± 0,02	15/0 0,91 ± 0,02	15/14 0,27 ± 0,02
14-е сут после ревакцинации	15/15 0,64 ± 0,05	15/0 0,91 ± 0,02	15/15 0,11 ± 0,01
40-е сут после ревакцинации	15/15 0,83 ± 0,02	15/0 0,89 ± 0,02	15/15 0,09 ± 0,01

* количество исследованных/положительных проб;

** среднее значение, $M \pm S$.

Значение ИФА для РРСС: $s/p < 0,4$ – специфические антитела отсутствуют,

$s/p \geq 0,4$ – наличие специфических антител;

значение ИФА для вируса БА: $s/p \geq 0,7$ – специфические антитела отсутствуют,

$s/p \leq 0,6$ – наличие специфических антител.

Таблица 2

Результаты исследования сывороток крови свиней после иммунизации вакциной против БА из маркированного штамма и РРСС инактивированной эмульгированной

$n = 80$

Группа животных	Уровень антител		
	РРСС	БА	
		gE	gB
До вакцинации	80/0* $0,15 \pm 0,02^{**}$	80/0 $0,95 \pm 0,02$	80/0 $0,91 \pm 0,02$
21-е сут после вакцинации	80/64 $0,49 \pm 0,02$	80/0 $0,86 \pm 0,02$	80/73 $0,15 \pm 0,02$
14-е сут после ревакцинации	80/73 $0,76 \pm 0,05$	80/0 $0,98 \pm 0,03$	80/80 $0,09 \pm 0,01$

* количество исследованных/положительных проб;

** среднее значение, $M \pm S$.

Значение ИФА для РРСС: $s/p < 0,4$ – специфические антитела отсутствуют;

$s/p \geq 0,4$ – наличие специфических антител;

значение ИФА для вируса БА: $s/p \geq 0,7$ – специфические антитела отсутствуют;

$s/p \leq 0,6$ – наличие специфических антител.

ному убою и проводили оценку степени поражения тканей по критериям, предложенным Н. Stone.

На начальном этапе работы проводили изучение антигенной активности вакцины против БА из маркированного штамма и РРСС инактивированной эмульгированной. Испытания проводили на серонегативных к вирусам БА и РРСС поросятах. Вакцину вводили внутримышечно в верхнюю треть шеи в дозе 2 см^3 с ревакцинацией на 21-е сут. За животными в течение 60 сут вели клиническое наблюдение, пробы крови отбирали до вакцинации, через 21 сут после нее, а также на 14-е и 40-е сут после ревакцинации (табл. 1).

Все животные до вакцинации были серонегативны к вирусам БА и РРСС. Специфические антитела к вирусам РРСС и БА выявляли с 21-х сут после иммунизации у 73 и 93% подсвинков соответственно. Специфические антитела к вирусу РРСС имели среднее значение s/p $0,42 \pm 0,02$, которое к 60-м сут (срок наблюдения) со-

ставляло $0,83 \pm 0,02$; к вирусу БА среднее значение s/p по гликопротеину gB составило $0,27 \pm 0,02$, к 60-м сут (срок наблюдения) – $0,09 \pm 0,01$, что говорит о достаточной антигенной активности вакцины. Антитела к гликопротеину gE в пробах сывороток крови отсутствовали на всех сроках отбора, что свидетельствует о выработке специфических антител после применения маркированной вакцины.

Изучение напряженности поствакцинального иммунитета по уровню специфических антител проводили в свиноводческом хозяйстве на животных, не привитых против БА и РРСС. Поросят иммунизировали испытываемой вакциной внутримышечно в дозе 2 мл двукратно: в возрасте 100 сут и через 3 нед. Пробы крови от свиней отбирали перед вакцинацией, перед ревакцинацией (через 3 нед после иммунизации) и через 2 нед после ревакцинации (табл. 2).

За животными был установлен постоянный клинический контроль. Наблюдение показало, что у 19% поросят на следующие сутки после вакцинации в месте введения вакцины имелись признаки легкого воспалительного процесса, который сопровождался незначительным безболезненным отеком. При этом гипертермической реакции, отказа от корма или состояния угнетения у вакцинированных животных не наблюдалось.

До вакцинации все животные были серонегативны к вирусам РРСС и БА. Через 3 нед после иммунизации у 80% животных выявили специфические антитела к вирусу РРСС и у 91% – к вирусу БА. Среднее значение s/p по гликопротеину gB на 21-е сут составило $0,15 \pm 0,02$, а через 14 сут после ревакцинации – $0,09 \pm 0,01$, что говорит о достаточной антигенной активности вакцины. Через 2 нед после ревакцинации 91,3% животных имели специфические антитела к вирусу РРСС и 100% – к вирусу БА. Антитела к гликопротеину gE в пробах сывороток крови отсутствовали на всех сроках отбора, что свидетельствует о выработке специфических антител после применения маркированной вакцины. Таким образом, одно- и/или двукратная вакцинация обеспечивала у привитого свиноголовья формирование выраженного иммунного ответа.

Следующим этапом работы было изучение антигенной активности и реактогенности вакцины против БА

Таблица 3

Результаты исследования сывороток крови свиней разных возрастных групп на наличие специфических антител после иммунизации вакциной против БА из маркированного штамма и ПВИС инактивированной эмульгированной

Возрастная группа	Количество вакцинированных животных	Уровень специфических антител				
		до вакцинации		через 40 сут после вакцинации		
		ПВИС	БА (gB)	ПВИС	БА	gE
Поросята 40–60 сут	80	$5,8 \pm 0,3$	$0,96 \pm 0,08$	$10,7 \pm 0,3$	$0,23 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,02$
Ремонтные свинки	80	$7,6 \pm 0,5$	$0,82 \pm 0,08$	$11,8 \pm 0,4$	$0,33 \pm 0,08$	$0,97 \pm 0,02$
Свиноматки	20	$10,5 \pm 0,3$	$0,83 \pm 0,08$	$12,2 \pm 0,5$	$0,42 \pm 0,0$	$0,87 \pm 0,02$
Хряки	10	$9,2 \pm 0,4$	$0,88 \pm 0,05$	$11,8 \pm 0,6$	$0,36 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,02$

* количество исследованных/положительных проб;

** среднее значение, $M \pm S$.

Значение ИФА для вируса БА: $s/p \geq 0,7$ – специфические антитела отсутствуют, $s/p \leq 0,6$ – наличие специфических антител;

значение РТГА для ПВИС: $> 7,0 \log_2$ – наличие специфических антител.

из маркированного штамма и ПВИС инактивированной эмульгированной. Испытания проводили в свиноводческом хозяйстве на животных различных возрастных групп. Пробы крови от свиней отбирали перед вакцинацией и через 40 сут после нее (табл. 3). Иммунизацию проводили согласно инструкции по применению.

Клинические наблюдения показали, что температура тела и основные физиологические показатели у привитых свиней оставались в пределах нормы, в месте введения препарата у части животных прощупывалась небольшая припухлость диаметром до 1–2 см.

Анализ данных, представленных в таблице 3, показывает, что до вакцинации специфические антитела к парвовирусу выявляли только в группах свиноматок и хряков. К вирусу БА все животные оставались серонегативными. Через 40 сут после вакцинации у животных всех групп выявляли специфические антитела к парвовирусу в динамике и к вирусу БА (gB) в достаточных титрах, в то же время у животных не выявили антитела к гликопротеину gE. Тем самым подтверждается наличие специфических антител только к вирусу БА вакцинного штамма. Применение данной вакцины способствовало формированию стойкого иммунитета у животных всех возрастных групп, подвергшихся иммунизации.

Изучение напряженности поствакцинального иммунитета по уровню специфических антител проводили в свиноводческом хозяйстве, где была сформирована группа из 50 голов свиней 2–4-месячного возраста, не привитых против БА и ПВИС. Животных иммунизировали двукратно внутримышечно в дозе 2 мл. Ревакцинацию проводили через 3 нед. Пробы крови от свиней отбирали перед вакцинацией, перед ревакцинацией и через 2 нед после ревакцинации (табл. 4).

За животными был установлен постоянный клинический контроль. На протяжении всего периода наблюдения температура тела и основные физиологические показатели у привитых свиней оставались в пределах нормы.

До вакцинации все животные были серонегативны к парвовирусу и вирусу БА. Через 21 сут после вакцинации 90% свиней имели специфические антитела к парвовирусу, среднее значение по группе составило $9,8 \pm 0,15 \log_2$; 84% свиней – к вирусу БА, среднее значение s/p по гликопротеину gB составило $0,37 \pm 0,08$. Через 2 нед после ревакцинации 100% свиней, иммунизированных предлагаемой вакциной, имели специфические антитела как к парвовирусу, так и к вирусу БА вакцинного штамма, что подтверждается отсутствием антител к гликопротеину gE.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» ассоциированные вакцины против болезни Ауески из маркированного штамма и парвовирусной инфекции свиней инактивированная эмульгированная и против болезни Ауески из маркированного штамма и репродуктивно-респираторного синдрома свиней инактивированная эмульгированная безвредны и обладают высокой эффективностью. Предлагаемые биопрепараты могут применяться для профилактической иммунизации свиней как в благополучных, так и в угрожаемых, неблагополучных по РРСС, БА и ПВИС хозяйствах. Применение данных вакцин позволяет дифференцировать животных, имеющих антитела к вакцинному (маркированному) и по-

Таблица 4

Результаты исследования сывороток крови после введения вакцины против БА из маркированного штамма и ПВИС инактивированной эмульгированной $n = 50$

Группа животных	Уровень антител		
	ПВИС	БА	
		gE	gB
До вакцинации	50/0* $7,8 \pm 0,2^{**}$	50/0 $1,02 \pm 0,02$	50/0 $0,98 \pm 0,01$
21-е сут после вакцинации	50/45 $9,8 \pm 0,15$	50/0 $1,0 \pm 0,04$	50/42 $0,37 \pm 0,08$
14-е сут после ревакцинации	50/50 $10,6 \pm 0,3$	50/0 $0,92 \pm 0,03$	50/50 $0,12 \pm 0,005$

* количество исследованных/положительных проб;

** среднее значение, $M \pm S$.

Значение ИФА для вируса БА: $s/p \geq 0,7$ – специфические антитела отсутствуют,

$s/p \leq 0,6$ – наличие специфических антител;

значение РТГА для ПВИС: $> 7,0 \log_2$ – наличие специфических антител.

левому штаммам вируса болезни Ауески. В связи с этим они также рекомендуются для использования в программах по контролю и искоренению БА в хозяйствах различной формы собственности для восстановления статуса благополучия по БА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 2. Рекомендации по болезням Списка МЭБ и другим важным для международной торговли болезням / OIE. – 25-е изд. – Paris, France: OIE, 2016. – Глава 8.2. – С. 455–462.
2. Шахов А. Г., Ануфриев А. И., Ануфриев П. А. Факторные инфекции свиней // Животноводство России. – 2004. – № 3. – С. 22–23; № 4. – С. 14–15.
3. Bätza 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.
4. Bell A. "Hot PRRS" is still hot // Pork. – 1998, February. – P. 32–33.
5. Diseases of Swine / ed. B. E. Straw [et al.]. – 9th ed. – Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. – 1143 p.
6. Immunoprophylaxis of porcine parvovirus infection / J. Jerabek [et al.] // Veterinarstvi. – 1986. – Vol. 36, No. 2. – P. 55–58.
7. Terrestrial Animal Health Code / OIE. – 26th ed. – Paris, France: OIE, 2017. – URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>.

REFERENCES

1. OIE Terrestrial Animal Health Code. Vol. 2. Recommendations applicable for the OIE listed diseases and other diseases important for international trade. 25th ed. Paris, France: OIE; 2016; Chapter 8.2: 455–462.
2. Shakhov A. G., Anufriyev A. I., Anufriyev P. A. Porcine factor infections [Faktornye infekcii svinej]. Zhivotnovodstvo Rossii. 2004; 3: 22–23; 4: 14–15 (in Russian).
3. Bätza H.-J. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. Proc. International Conference on the Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination. Buenos Aires; 2004: 81–82.
4. Bell A. "Hot PRRS" is still hot. Pork. 1998: 32–33.
5. Diseases of Swine / ed. B. E. Straw [et al.]. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006.
6. Jerabek J. et al. Immunoprophylaxis of porcine parvovirus infection. Veterinarstvi. 1986; 36 (2): 55–58.
7. OIE Terrestrial Animal Health Code. 26th ed. Paris, France: OIE; 2017. URL: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>.

Поступила 03.06.17

Принята в печать 24.01.18

УДК 619:616.98:578.842.1:616-036.22(415)

DOI 10.29326/2304-196X-2018-2-25-18-25

ЭПИЗООТИЯ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ 2007–2017 ГГ.

ЧАСТЬ 1. ОБЩИЕ ТРЕНДЫ АЧС НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ЕВРАЗИИ

А. С. Оганесян¹, М. А. Шибаяев², Н. Е. Баскакова³, Ф. И. Коренной⁴, А. К. Караулов⁵

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

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

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

⁴Научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: korennoy@arriah.ru

⁵Руководитель ИАЦ, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: karaulov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты ретроспективного анализа эпизоотической ситуации по африканской чуме свиней в Российской Федерации, включающего анализ хронологии развития эпизоотии, в котором выделены значимые события при распространении болезни по территории страны. Показан общий тренд и темп эпизоотии африканской чумы свиней 2007–2017 гг. на территории Евразии по числу пораженных стран ($1,273 \pm 1,272$ страны/год) и субъектов Российской Федерации ($4,5 \pm 2,3$ субъекта/год). Также в работе акцентируется внимание на некоторых особенностях эпизоотического процесса в зависимости от сезона года. Рассмотрены вероятные социальные и биологические факторы, способствующие распространению эпизоотии. Обсуждена необходимость дальнейших поисков вероятного биологического вектора и изучения социальной составляющей, возможно способствующих поддержанию очагов болезни в дикой природе и среди домашних свиней на территории России и стран Восточной Европы.

Ключевые слова: африканская чума свиней, домашние свиньи, дикие кабаны, эпизоотия, сезонность заболевания.

UDC 619:616.98:578.842.1:616-036.22(415)

AFRICAN SWINE FEVER EPIDEMIC IN 2007–2017

PART 1. COMMON TRENDS FOR ASF IN THE RUSSIAN FEDERATION AND IN EURASIA

A. S. Oganessian¹, M. A. Shibayev², N. Ye. Baskakova³, F. I. Korennoy⁴, A. K. Karaulov⁵

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

²Head of Unit, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shibaev@arriah.ru

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

⁴Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: korennoy@arriah.ru

⁵Head of Information Analysis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: karaulov@arriah.ru

SUMMARY

Results of retrospective analysis of African swine fever epidemic situation in the Russian Federation including analysis of the epidemic chronology indicating significant events of the disease spread across the country territory are presented. Common ASF epidemic trend and rate in 2007–2017 in Eurasia territory based on number of infected countries (1.273 ± 1.272 countries/year) and in Russian Federation Subjects (4.5 ± 2.3 Subjects/year) are shown. The paper also addresses some peculiarities of the epidemic process depending on the season of a year. Possible social and biological factors contributing to the epidemic spread are examined. Necessity of further search for probable biological vector and examination of social factors that could contribute to the disease maintenance in wild life and in domestic pigs in the Russian Federation and Eastern European countries are discussed.

Key words: African swine fever, domestic pigs, wild boar, epidemic, seasonality of disease.

ВВЕДЕНИЕ

Колоссальные усилия, предпринимаемые ветеринарными службами стран как пострадавших от африканской чумы свиней (АЧС), так и оказавшихся в зоне риска распространения болезни, несмотря ни на что, не тормозят распространения АЧС 2-го генотипа на континенте с момента его появления в 2007 г. на территории Грузии. Разработка стратегии по борьбе с заболеванием на территории отдельной страны требует концентрации значительных ресурсов как материальных, так и научных, принятия во внимание различных факторов [8, 12], а также консолидации научного и управленческого звеньев на международном уровне. Обсуждение сложившейся ситуации с АЧС ведется экспертами постоянно и касается разработки стратегий по борьбе со вспышками заболевания и искоренения АЧС, включая методы диагностики и эмерджентного планирования на соответствующих территориях, вопросы дезинфекции, управления популяцией дикого кабана [10]. Например, учитываются особенности ведения свиноводства в регионе, структура популяции, технологические циклы, культура содержания свиней в хозяйствах различного уровня, внутренние и межхозяйственные связи в очаге и на прилегающих территориях, зонирование, наличие восприимчивого поголовья животных и возможное присутствие вектора, а также транспортные связи и этнические особенности населения, вовлеченного в свиноводческую деятельность, работа ветеринарной службы и прочие факторы.

В течение продолжающейся эпизоотии особый интерес представляет хронология и характер территориального распространения АЧС, а также общий тренд развития эпизоотической ситуации по АЧС на территории стран Евразии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали официальные данные Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) и ФГБУ «Центр ветеринарии» МСХ РФ об эпизоотической ситуации на территории Российской Федерации и стран мира по АЧС в 2007–2017 гг. на 29 декабря 2017 г. [12, 13], данные из открытых источников о мерах борьбы в странах ЕС [3, 7, 11, 14] и в Российской Федерации.

Анализ развития эпизоотии в России проводили ретроспективно. Общие тренды развития эпизоотии АЧС в 2007–2017 гг. в разрезе РФ и стран Евразии выражали как графически (в виде построения полиномиальных трендов по суммарному числу стран / субъектов РФ, где отмечено неблагополучие), так и в виде расчета средних значений вновь пораженных стран / субъектов РФ за год (темп эпизоотии).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ хронологии развития эпизоотии АЧС в РФ в 2007–2017 гг. С 2007 по декабрь 2017 г. (на 31 декабря 2017 г., рис. 1) на территории Российской Федерации зарегистрировано 1252 очага АЧС (765 – в домашней, 487 – в дикой популяции). Первая вспышка АЧС на территории РФ выявлена 5 ноября 2007 г. Всего за этот период страной нотифицировано в МЭБ 1252 очага АЧС в 50 субъектах страны [12].

Анализ хронологии развития эпизоотии АЧС в РФ в этот период позволяет выделить несколько ключевых моментов:

– **2007 г.** – занос АЧС на территорию Российской Федерации;

– **2008–2010 гг.** – формирование южной неблагополучной зоны по АЧС. Первые выносные случаи АЧС в Оренбургскую и Ленинградскую области (1 выносной случай/год) выявили еще одну возможность негативного сценария развития эпизоотии на территории страны, при котором вынос происходит на значительные расстояния;

– **2011 г.** – происходит драматическое изменение ситуации по АЧС. Зафиксирован всплеск выносных случаев АЧС (22 выноса/год) из сформировавшейся на то время южной неблагополучной зоны. В течение года зарегистрированы выносы АЧС в Воронежскую, Саратовскую, Архангельскую, Мурманскую, Нижегородскую, Тверскую, Курскую области. Началось формирование вторичной северной неблагополучной зоны АЧС на территории Тверской области;

– **2012–2014 гг.** – сформировавшиеся зоны неблагополучия расширяются, объединяясь в единую центральноевропейскую неблагополучную зону. В эпизоотию вовлекаются ранее благополучные субъекты РФ (Республика Карелия, Псковская, Новгородская, Ярославская, Московская, Тульская, Орловская, Калужская, Владимирская, Ивановская, Смоленская, Брянская, Тамбовская области). По состоянию на 2012 г. – 46 выносных случаев/год;

– **2015 г.** – отмечается тотальное распространение АЧС по Рязанской области на фоне неблагополучия ранее затронутых регионов;

– **2016 г.** – сценарий распространения АЧС со значительным количеством выносных случаев проявляет себя вновь. На этот раз под ударом оказываются ранее благополучные территории Приволжского федерального округа: Пензенская область, Чувашская Республика, Республика Татарстан. Масштабный занос происходит в Нижегородскую область, ранее имевшую передовой опыт ликвидации АЧС на своей территории. Зафиксированы первые случаи болезни в Липецкой области. А выносы АЧС в Вологодскую и Архангельскую области вновь указали на сложность контроля нелегального перемещения товаров, сопряженных с высоким риском по АЧС, и обозначили ведущую роль человеческого фактора при трансграничном распространении АЧС на значительные расстояния;

– **начало 2017 г.** ознаменовалось достаточно неординарным событием – выносом АЧС за пределы центральноевропейской неблагополучной зоны в Иркутскую область.

– **осень 2017 г.** АЧС была зарегистрирована еще в 5 субъектах РФ за Уральским хребтом: в Челябинской, Тюменской, Омской областях, Красноярском крае и Ямало-Ненецком автономном округе. Произошла экспансия АЧС в восточном направлении (Сибирь). В Калининградской области выявлены случаи заболевания среди диких кабанов. Зафиксирована вспышка АЧС на крупном свинокомплексе в Белгородской области [13].

Предпосылки к широкому территориальному распространению АЧС в 2017 г. возникли еще в 2016 г. Так, в течение 2016 г. болезнь поразила не только субъекты Центрального федерального округа РФ (Воронежская, Тамбовская, Орловская, Московская, Владимирская, Брянская, Курская, Смоленская, Калужская, Иванов-

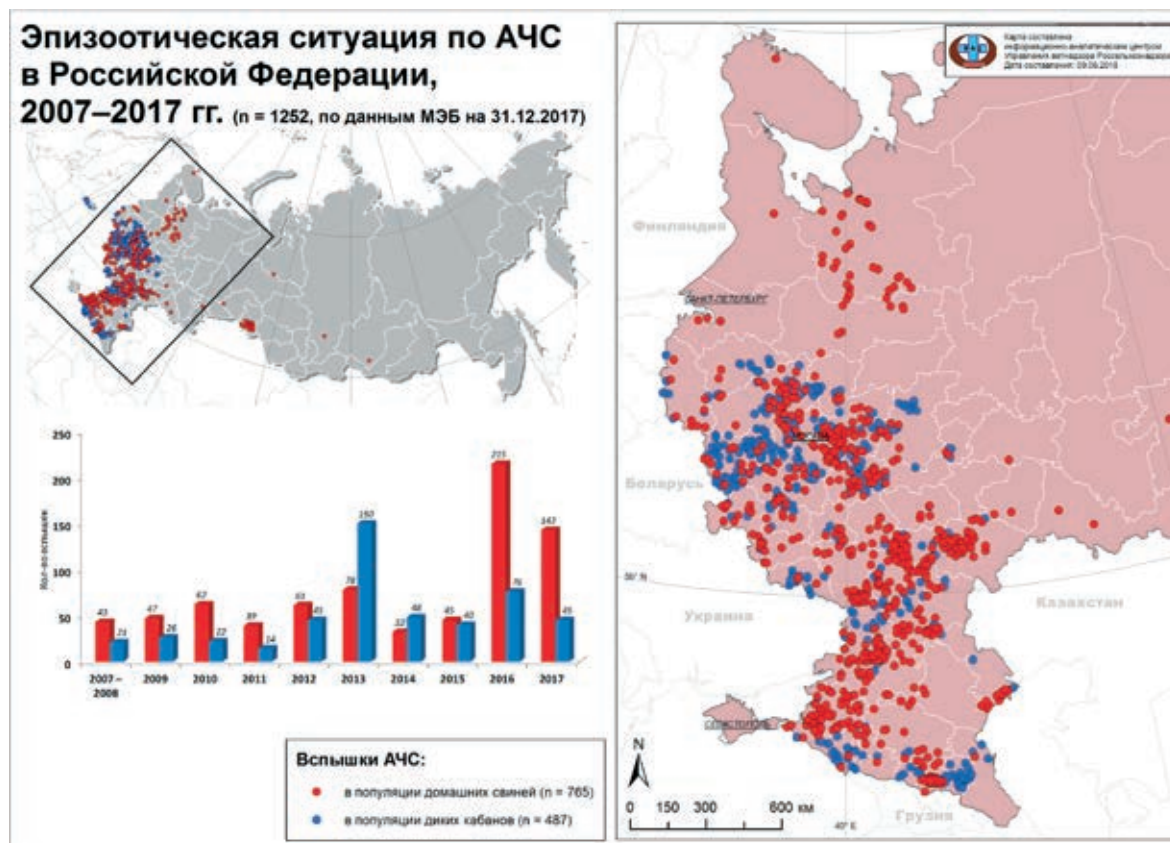


Рис. 1. Эпизоотическая ситуация по АЧС на территории РФ в 2007–2017 гг. (по данным на 31.12.2017)

ская, Липецкая области), где промышленное свиноводство является достаточно значимой отраслью, но и новые территории Приволжского федерального округа (Ульяновская, Пензенская, Саратовская, Нижегородская области, Чувашия, Татарстан), в которых значительная популяция домашних свиней сосредоточена у сельского населения, традиционно занимающегося выращиванием этих животных.

Основную озабоченность вызывает перспектива дальнейшего развития эпизоотии по негативному сценарию 2012–2014 гг., а именно: вероятность формирования вторичной восточной неблагополучной зоны АЧС на территории субъектов Приволжского федерального округа и постепенное расширение ее границ на соседствующие субъекты Уральского федерального округа и выносы АЧС в субъекты Сибирского федерального округа.

Не затрагивая вопроса распространения АЧС в популяции дикого кабана, по материалам ранее опубликованных работ можно отметить, что антропогенный фактор при распространении АЧС в РФ является преобладающим [2, 4]. Основными целевыми популяциями при распространении вируса АЧС остаются личные подсобные хозяйства (ЛПХ), при этом средняя prevalентность заболевания в них на момент проведения санитарно-ограничительных мероприятий составляет $46 \pm 43,7\%$ (среднее $\pm$ стандартное отклонение), т. е. можно констатировать факт запаздывания распознавания болезни в очаге заболевания [2].

С другой стороны, по результатам эпизоотологических исследований случаев вспышек АЧС на крупных фермах и в ЛПХ можно констатировать, что, несмотря

на достаточно хороший уровень осведомленности владельцев животных о биологических путях заноса и распространения АЧС, проявился фактор осознанного и неосознанного* следования рискованным путем (*в отношении АЧС среди диких кабанов в ЕС упоминается как «непреднамеренный» [7]).

Осознанный путь – это намеренные действия владельцев животных при осознании угрозы (закупка молодняка, кормов, мясoproductов из неизвестного/незаконного источника, экономия на обработке кормов и пищевых отходов, используемых в качестве корма свиньям). Указанный путь наиболее свойственен ЛПХ и мелким фермам.

Неосознанный путь – непреднамеренные действия владельцев животных при отсутствии полного осознания угрозы. Свойственен и ЛПХ, и крупным хозяйствам. Например, когда соблюдение мероприятий по биозащите хозяйства (установка дезбарьеров, заборов, введение пропускного режима) рассматривается только с точки зрения снятия административного барьера для получения статуса «защищенности». В ЛПХ же следование правилам биозащиты хозяйства (смена одежды, контроль использования инвентаря, организация процессов кормления, поения и содержания свиней и т. д.), при всем добросовестном стремлении фермера выполнять их, зачастую носит формальный характер по причине материально-технических или организационных ограничений.

Естественно, в большинстве случаев указанные пути представлены либо в комбинации, либо проявляются последовательно, дополняя друг друга. Ярким примером реализации комбинированного пути в ЛПХ

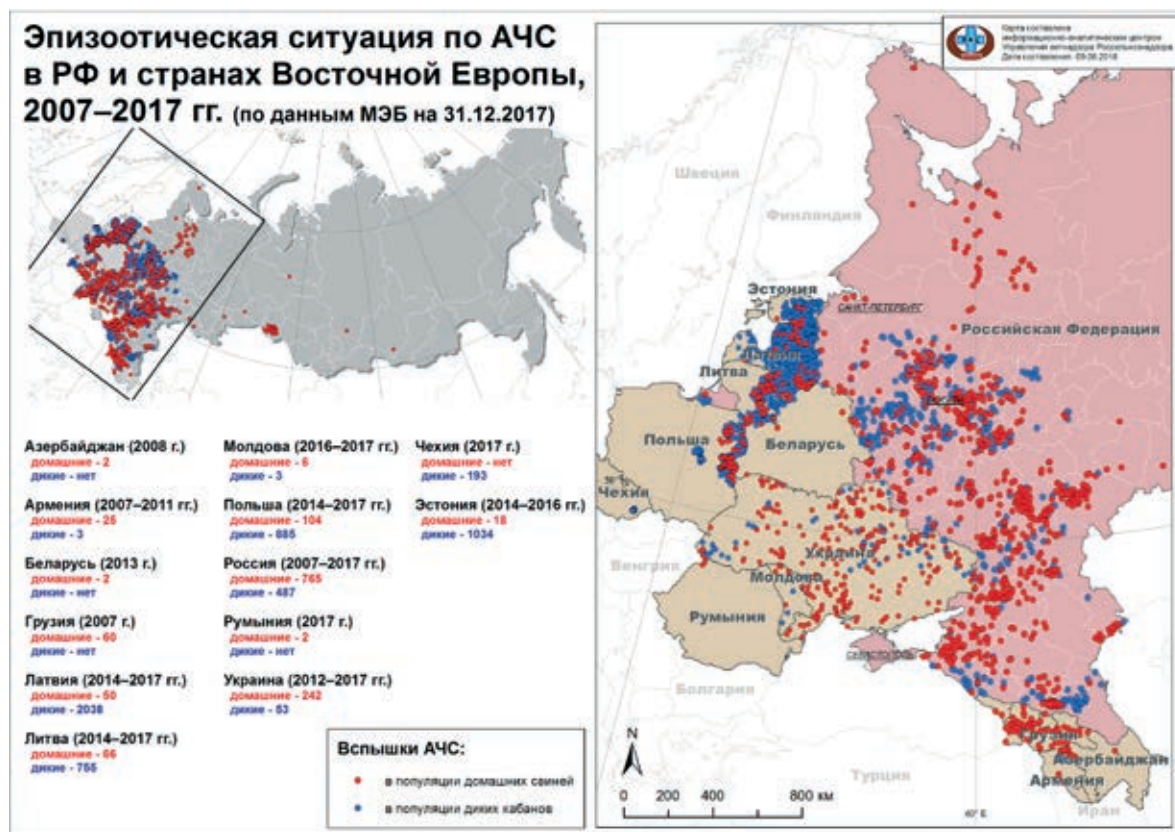


Рис. 2. Эпизоотическая ситуация по АЧС в РФ, странах Европы и Закавказья в 2007–2017 гг. (по данным на 31.12.2017)

служит отрицание факта возможной контаминации зерновых кормов вирусом АЧС при использовании его в необработанном виде в корм свиньям в периоды валового сбора зерна. И здесь необходимо прояснить вероятный риск. Действительно, зерно, отгружаемое с элеваторов, проходит сушку в температурных режимах, обезвреживающих вирус, который может присутствовать на нем в качестве контаминанта (в результате контакта с дикими кабанями). Но приобретение обработанного зерна с элеватора хозяином ЛПХ является достаточно затратным с финансовой точки зрения. Следовательно, в ряде случаев в корм используется зерно, которое не проходит надлежащей обработки. Иными словами, недостаточная осведомленность владельцев животных об инфекции, вследствие недостаточной популяризации знания по данному аспекту со стороны компетентных служб и органов, подкрепляется фактически неполноценными организационно-ограничительными моментами. Ввиду данного факта, на подверженность распространению болезни в субъектах РФ будут в значительной мере/степени влиять наличие ЛПХ, занимающихся содержанием свиней, и количество животных в них [4]. Кроме того, регистрация вспышек АЧС на крупных свиноводческих предприятиях с пробелами в организационно-ограничительных мероприятиях, по сути, ставит их в один ряд с незащищенными с биологической точки зрения хозяйствами (ЛПХ). А следовательно, наталкивает на гипотезу о сходности причин возникновения и путей заноса болезни на предприятия. Поняв указанные причины заноса на одном уровне (незащищенных популяций), можно с определенной долей уверенности

экстраполировать их на другие уровни, что в конечном итоге должно зеркальным образом отразиться на мерах борьбы и превенции.

Общие тренды эпизоотии 2007–2017 гг. на территории Евразии. Рассматривая эпизоотию АЧС 2-го генотипа не только на территории РФ, но и, в более глобальных масштабах, на территории континента (Евразии), следует отметить, что тенденция террито-

Таблица 1
Хронология распространения АЧС 2-го генотипа в Евразии в 2007–2017 гг.

Год	Страна	Количество стран, сообщивших об АЧС
2007	Грузия, Армения, РФ	3
2008	Азербайджан	4
2009	–	4
2010	Иран (сезон 2008–2009 гг. [7])	5
2011	–	5
2012	Украина	6
2013	Беларусь	7
2014	Литва, Польша, Латвия, Эстония	11
2015	–	11
2016	Молдова	12
2017	Румыния, Чехия	14

Развитие эпизоотической ситуации по АЧС на территории Евразии, 2007–2017 гг.



Рис. 3. Развитие эпизоотической ситуации по АЧС на территории Евразии в 2007–2017 гг.

риального расширения эпизоотии АЧС в 2007–2017 гг. проявила себя угрожающе.

Как видно из представленной таблицы, за *первые 4 года (2007–2010 гг.)* после заноса АЧС 2-го генотипа на наш континент были поражены 5 стран (Грузия, Армения, Азербайджан, Иран [6] и РФ), т. е. в основной своей массе страны (исключая РФ), где свиноводство традиционно играет второстепенную роль либо вообще является «экзотическим» видом деятельности.

В течение *последующих 4 лет (2011–2014 гг.)* эпизоотия охватила еще 6 стран (Украина, Беларусь, Литва, Польша, Латвия, Эстония). При этом во всех пораженных странах потребление свинины традиционно высоко, а свиноводство ведется промышленными масштабами. Страны участвуют в международном обороте свиней и продукции свиноводства (рис. 2).

В *2015–2017 гг.* можно констатировать лишь ухудшение ситуации на территории пораженных АЧС стран европейской части Евразии (рис. 3). Это фактически тотальное поражение Эстонии, восточной части Латвии и Литвы, Украины, распространение в Польше (долго остававшиеся стабильными границы неблагополучия Подляского воеводства оказались прорванными), значительное территориальное распространение в РФ. За последние два года о неблагополучии официально объявили Молдова (2016 г.), Чехия и Румыния (2017 г.) [13].

Представляя суммарные тренды эпизоотии АЧС в 2007–2017 гг. на территории Евразии (рис. 4), можно отметить общее нарастание числа неблагополучных регионов.

Общий темп, с которым развивалась эпизоотия в течение 2007–2017 гг., выражен в таблице на рисунке 4

в виде среднего числа вновь пораженных стран в год. Отдельно для территории РФ показатель темпа эпизоотии представлен средним числом новых неблагополучных субъектов РФ в год. Данные показатели составили $1,273 \pm 1,272$ страны в год и $4,5 \pm 2,3$ субъекта РФ в год.

Накопленные за 10-летний опыт борьбы с эпизоотией АЧС данные позволяют оценить сезонность заболевания. Пик проявления АЧС на территории РФ и стран Евразии среди домашних свиней и диких кабанов, регистрировавшийся в июле (июнь – август) [3, 10], может свидетельствовать не столько об истинной сезонности, сколько о необходимости изучения данного явления [7]. Дело в том, что достоверного биологического обоснования летняя сезонность АЧС у дикого кабана не находит (в силу отсутствия достоверных данных о наличии сальватического цикла либо цикла «клещ – свинья» [8] на территории РФ и стран Восточной Европы, где бы участвовал амплификатор вируса, сходный с клещами *Ornithodoros* или дикими бородавочниками [2, 10]) и, скорее всего, она связана с общим летним пиком АЧС среди домашних свиней. В свою очередь, летний пик заболеваемости среди домашних и диких свиней может быть связан с увеличением количества возможных не прямых контактов диких и домашних свиней за счет интенсификации сельскохозяйственной (сбор озимых культур / полевые работы), туристической (внутренний туризм, посещение лесов / сбор ягод, пикники и т. п.) и садоводческой (дачный сезон) деятельности человека в местах концентрации ЛПХ (сельская местность) и местах обитания кабана [10]. Иными словами, именно в летний период можно предполагать высокую вероятность всплеска не прямых контактов домашней и дикой

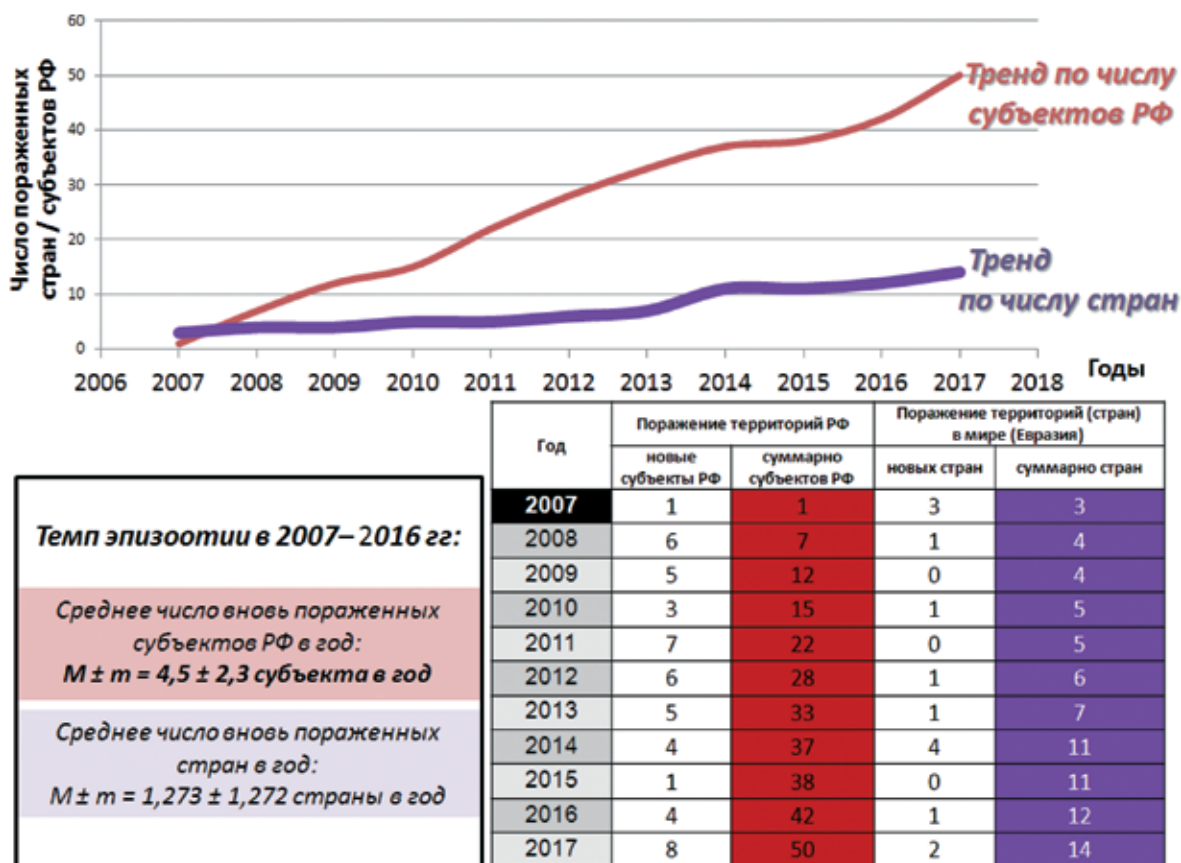
популяции за счет антропогенного фактора [4]. А существующая зимняя сезонность АЧС среди диких кабанов на территории стран Евразии объясняется интенсификацией добычи кабана (гипердиагностика) [7]. В любом случае выяснение причин, играющих решающую роль в сезонном всплеске АЧС, может иметь большое значение для профилактики заболевания.

Ввиду того что самозатухания эпизоотического процесса при АЧС в условиях европейской части континента в дикой природе не происходит (как можно предположить для высококонтагиозных возбудителей), необходима логическая модель, объясняющая «псевдоциркуляцию» вируса. Одним из примеров такого объяснения может служить гипотеза «супер-насыщения окружающей среды», согласно которой в ходе эпизоотической вспышки АЧС на отдельной местности в эпизоотический процесс, посредством контаминации/насыщения вирусом окружающей среды и не прямых контактов, вовлекаются дикая, слабозащищенная домашняя популяции и в итоге (при малейшем нарушении ветеринарно-санитарного режима) – «защищенная» популяция свиноводческого предприятия. При этом вопрос о выживании кабанов и свиней после заражения вирусом АЧС 2-го генотипа достаточно интересен с эпизоотологической точки зрения. Несмотря на малое число выживающих/долгоживущих зараженных свиней или кабанов в ходе экспериментального заражения [5], подобные случаи могут свидетельствовать о наличии в природной среде таких животных, которые, по всей вероятности, вносят вклад в «псевдоциркуляцию» вируса АЧС как в дикой

фауне, так и в условиях малых ферм (ЛПХ), для которых свойственно запаздывание распознавания болезни в популяции при показанном индексе контагиозности 0,08 [10]. Какую роль играют «долгоживущие» особи в эпизоотическом процессе – вопрос актуальный. Вероятное наличие «долгоживущих» и «псевдоциркуляция» вируса АЧС в слабозащищенной домашней и дикой популяции может отчасти объяснять низкую эффективность усилий по зонированию по АЧС, основанному на двух инкубационных периодах, и вялотекущий характер эпизоотии.

Другим возможным фактором, способствующим «псевдоциркуляции» АЧС в дикой фауне, может служить биология кабана, и в частности его поведенческие особенности: стадный образ жизни и ограничения в контактах между стадами животных при оседлом образе жизни [7, 10]. Вероятнее всего, этим объясняются довольно низкие темпы межстадного распространения АЧС в популяции диких кабанов. Сдвиг сезонности вспышек на летний период может быть обусловлен не только непрямыми контактами домашних и диких животных, но и тем, что под влиянием повышенной активности хозяйственной деятельности человека в летний период происходит изменение образа жизни кабана (перемещение стад в направлениях, отличных от привычных мест обитания, в том числе на значительные расстояния). То есть происходит распугивание кабанов, поэтому увеличивается вероятность контактов между особями разных стад. С другой стороны, на вероятность контактов не могут не оказывать влияния планомерные, периодически проводимые меропр-

Рис. 4. Общие тренды эпизоотии АЧС в 2007–2017 гг.



ятия по снижению численности диких свиней (2014–2017 гг.), в результате которых плотность популяции можно считать относительно низкой и находящейся под контролем при учете высокой воспроизводительной способности [2, 7, 10].

Подход к организации противоэпизоотических мер в борьбе с АЧС в дикой и домашней популяциях отчасти строится ветеринарными службами пораженных стран с оглядкой на опыт борьбы с классической чумой свиней (КЧС). Поэтому учету не прямых контактов и контаминации окружающей среды, за исключением устранимости туш павшего кабана из лесов, придается вторичное значение. Существенные различия в коэффициентах базовой репродукции инфекции (R_0) для КЧС и АЧС [9] и отсутствие эпидемических волн при АЧС [10] свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований на способах передачи АЧС в полевых условиях и на экологических факторах, таких как почва и организмы вокруг живого и павшего дикого кабана (насекомые и личинки, черви). Вероятно, актуальным будет прояснение вопроса вовлеченности в процесс заражения насекомых, контактирующих косвенно с кабанами и домашними свиньями через сырые корма (например, исключение роли насекомых – вредителей сельскохозяйственных культур в местах обитания/питания кабана и местах заготовки зерновых кормов для ЛПХ).

Анализ распространения АЧС в Российской Федерации позволяет констатировать, что выносы заболеваемости на значительные расстояния могут произойти лишь в очень редком случае – нелегальные перемещения инфицированного мяса или свиней из неблагополучных регионов. Очень редко и в ограниченных количествах/объемах такая продукция из ЛПХ транспортируется на большие расстояния. Между территориями, и тем более субъектами РФ, такой легальной торговли мясом (из ЛПХ или незащищенных/слабозащищенных ферм), для которой свойственно поступление значительных объемов продукции в легальный оборот, не происходит. В большинстве же случаев популяции мелких ферм и ЛПХ используются для получения мяса и продажи его на локальном рынке или для собственного потребления, с чем связывается механизм локального распространения.

Другой (легальный) – крайне негативный – сценарий возникает при межсубъектовом обороте свинины, когда в силу сложности логистических и торговых путей инфицированное АЧС мясо как импортного, так и российского производства, нелегально попав в торговый оборот, получает потенциал к распространению на значительное расстояние (тысячи километров) внутри страны по легальным каналам торговли. Поэтому контроль на границе и транспорте должен быть максимально строг, и в настоящее время повышенное внимание должно уделяться вопросам соблюдения биобезопасности предприятий промышленного свиноводства и мясокомбинатов.

Таким образом, диффузный характер эпизоотии АЧС с выносными случаями на территории различных стран Евразии проявляется вне зависимости от административных границ и природных барьеров, национальной принадлежности, о чем свидетельствует все расширяющаяся эпизоотия АЧС. Например, Польша, создав ряд зон (2014/709/ЕС), с февраля 2014 по август 2017 г. 32 раза изменяла их границы [14]. В РФ за 10 лет (2007–2017 гг.) АЧС зарегистрирована в 50 субъектах

(из 85) [12]. Факт того, что вспышки АЧС, несмотря на применяемые пораженными странами меры, происходят на значительном удалении от остальных очагов АЧС (например, в РФ – за тысячи километров, заражение на островных территориях Эстонии, выносы в Молдавию), свидетельствует, что фактически меры борьбы с АЧС как в ЕС, так и в РФ имеют пока недостаточную эффективность. Несмотря на блестяще обоснованные законами и национальными нормативами меры, принимаемые на бумаге, все, к сожалению, разбивается о действительность (случаи АЧС на крупных защищенных комплексах в РФ, Литве, Эстонии).

Человеческий фактор, по всей вероятности, остается ведущим для территорий стран с развитым свиноводством, как было отмечено по результатам расследований, проводимых надзорными органами в ЕС, и по результатам анализа локальных и выносных вспышек на территории РФ [3, 4, 10, 11]. Вероятными причинами возникновения на новых территориях и локального распространения АЧС являются нелегальные перемещения / торговля свиньями и продуктами свиноводства между зонами риска; неавторизованные (нелегальные и нарушающие безопасность) осознанные и неосознанные действия в ЛПХ и на свиноводческих предприятиях, высокая вероятность всплеска не прямых контактов домашней и дикой популяции за счет антропогенного фактора в летний период.

Поведение людей в эпизоотологии АЧС [4, 7, 10] заставляет обратить внимание на подходы, применяемые в прогнозировании распространения болезней и учитывающие социальную составляющую [1]. Создание моделей, описывающих распространение АЧС, с определением ролей каждой восприимчивой и невосприимчивой популяции (домашние свиньи, кабаны, сельское и городское население, вовлеченное и не вовлеченное в свиноводство и т. д.), прямо или косвенно участвующей в поддержании процесса распространения и «псевдоциркуляции» болезни, возможно, поможет не только в прогнозировании АЧС в РФ и пораженных странах, но и в поиске мер социальной направленности, устраняющих механизмы формирования групп риска, которые способствуют устранению человеческого фактора из эпизоотического процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Средние темпы эпизоотии АЧС в 2007–2017 гг. на территории Евразии составили $1,273 \pm 1,272$ страны в год. Для территории РФ среднее число пораженных за год субъектов составило $4,5 \pm 2,3$.

Как и все предыдущие годы, 2016-й и 2017-й не стали исключением в отношении расширения границ эпизоотии АЧС 2-го генотипа в западном направлении (о неблагополучии официально объявила Молдова, Румыния, Чехия, Калининградская область, расширилась неблагополучная зона АЧС в Польше).

Выявился выносной тренд эпизоотии и в восточном направлении (выносы в субъекты Приволжского и Сибирского федеральных округов РФ).

Выносные вспышки АЧС, несмотря на принимаемые странами меры, происходят на значительном удалении друг от друга. Человеческий фактор является ведущим для территорий стран с развитым свиноводством как при осознанных, так и неосознанных действиях. Летняя сезонность регистрации АЧС

может свидетельствовать о влиянии на нее всплеска сельскохозяйственной и туристической активности в местах сосредоточения кабана. Исследования, направленные на изучение непрямых механизмов передачи АЧС в полевых условиях, экологические факторы (такие как почва и организмы вокруг дикого кабана и домашних свиней), а также изучение сезонности и роли «долгоживущих» инфицированных особей и механизмов формирования групп риска, связанных с человеческим фактором, помогут прояснить картину циркуляции АЧС 2-го генотипа в условиях европейской части континента и РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Носова Е. А. Анализ и математическое моделирование распространения ВИЧ-инфекции: дис. ... канд. физ.-мат. наук. – М., 2013. – 116 с.
- Прогноз по африканской чуме свиней в Российской Федерации на 2012 год / С. А. Дудников, О. Н. Петрова, А. С. Оганесян [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2011. – 35 с.
- Прогноз по африканской чуме свиней в Российской Федерации на 2017 год / О. Н. Петрова, Ф. И. Коренной, Н. С. Бардина [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2017. – 31 с. – URL: https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/publications/asf_prognoz17.pdf.
- Структура современного ареала распространения африканской чумы свиней в Российской Федерации / В. А. Журавлева, В. М. Лыска, А. П. Васильев [и др.] // Ветеринария. – 2017. – № 11. – С. 3–6.
- Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from North-Eastern Estonia in European wild boar / I. Nurmoja, A. Petrov, C. Breidenstein [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2017. – Vol. 64, No. 6. – P. 2034–2041. – DOI: 10.1111/tbed.12614.
- Emergence of African swine fever virus, Northwestern Iran / P. Rahimi, A. Sohrabi, J. Ashrafihelan [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 16, No. 12. – P. 1946–1948. – DOI: 10.3201/eid1612.100378.
- Epidemiological analyses of African swine fever in the Baltic States and Poland (Update September 2016 – September 2017) / K. Depner, C. Gortázar, V. Guberti [et al.]; EFSA // *EFSA J.* – 2017. – Vol. 15(11): 5068. – 59 p. – DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5068.
- Epidemiology of African swine fever virus / S. Costard, L. Mur, J. Lubroth [et al.] // *Virus Res.* – 2013. – Vol. 173, No. 1. – P. 191–197.
- Schulz K., Staubach C., Blome S. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences // *Vet. Res.* – 2017. – Vol. 48(1): 84. – DOI: 10.1186/s13567-017-0490-x.
- Standing Group of Experts on African swine fever in the Baltic and Eastern Europe region. – URL: http://web.oie.int/rr-europe/eng/Regprog/en_GF_TADS%20-%20Standing%20Group%20ASF.htm.
- http://ec.europa.eu/food/audits-analysis/audit_reports/index.cfm.
- <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac>.
- http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.
- https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/asf_en.

REFERENCES

- Nosova Ye. A. Analysis and mathematic modelling of HIV infection spread: PhD theses ... Candidate of Science (Physics and Mathematics) [Analiz i matematicheskoe modelirovanie rasprostraneniya VICH-infekcii: dis. ... kand. fiz.-mat. nauk]. M; 2013 (in Russian).
- Dudnikov S. A., Petrova O. N., Oganiesyan A. S. et al. Prediction on African swine fever in the Russian Federation for 2012 [Prognoz po afrikanskoj chume svinej v Rossijskoj Federacii na 2012 god]. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2011 (in Russian).
- Petrova O. N., Korennoy F. I., Bardina N. S. et al. Prediction on African swine fever in the Russian Federation for 2017 [Prognoz po afrikanskoj chume svinej v Rossijskoj Federacii na 2017 god]. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2017. URL: https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/publications/asf_prognoz17.pdf (in Russian).
- Zhuravleva V. A., Lyska V. M., Vasylyev A. P. et al. Current habitat structure of African swine fever in the Russian Federation [Struktura sovremennogo areala rasprostraneniya afrikanskoj chumy svinej v Rossijskoj Federacii]. *Veterinariya*. 2017; 11: 3–6 (in Russian).
- Nurmoja I., Petrov A., Breidenstein C. et al. Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from North-Eastern Estonia in European wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (6): 2034–2041. DOI: 10.1111/tbed.12614.
- Rahimi P., Sohrabi A., Ashrafihelan J. et al. Emergence of African swine fever virus, Northwestern Iran. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16 (12): 1946–1948. DOI: 10.3201/eid1612.100378.
- Depner K., Gortázar C., Guberti V. et al.; EFSA. Epidemiological analyses of African swine fever in the Baltic States and Poland (Update September 2016 – September 2017). *EFSA J.* 2017; 15 (11):5068. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5068.
- Costard S., Mur L., Lubroth J. et al. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.* 2013; 173 (1): 191–197.
- Schulz K., Staubach C., Blome S. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet. Res.* 2017; 48 (1):84. DOI: 10.1186/s13567-017-0490-x.
- Standing Group of Experts on African swine fever in the Baltic and Eastern Europe region. URL: http://web.oie.int/rr-europe/eng/Regprog/en_GF_TADS%20-%20Standing%20Group%20ASF.htm.
- http://ec.europa.eu/food/audits-analysis/audit_reports/index.cfm.
- <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac>.
- http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.
- https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/asf_en.

Поступила 09.02.18

Принята в печать 22.05.18

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ 146S КОМПОНЕНТА ВИРУСА ЯЩУРА В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

М. И. Доронин¹, А. М. Тимина², Д. А. Лозовой³, В. А. Стариков⁴, Д. В. Михалишин⁴, Н. Н. Медведева⁶, А. В. Борисов⁷

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

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

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

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

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

⁶ Биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: medvedeva@arriah.ru

⁷ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: borisov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработан способ определения концентрации 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Предложена отрицательная регрессионная модель вида $C_{146S} = (30,269 - C_i)/4,155$, позволяющая определять значение концентрации 146S частиц вируса ящура на основании установленной величины порогового цикла амплификации (C_i). Экспериментально доказано, что количество 146S компонента, определенного методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием разработанной регрессионной модели и заложенного в прививную дозу противоящурной вакцины, позволяет защитить вакцинированных животных от генерализованной формы ящура типов А, О, Азия-1. Метод ОТ-ПЦР-РВ является высокочувствительным, позволяет быстро и с высокой степенью достоверности оценивать концентрацию 146S антигена в противоящурной вакцине. Способ определения количества 146S частиц методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием регрессионной модели является надежным и характеризуется высокой корреляцией (95,5–99,0%) с результатами реакции связывания комплемента.

Ключевые слова: вирус ящура, концентрация 146S компонента, ОТ-ПЦР-РВ, пороговый цикл амплификации.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозное везикулярное вирусное заболевание парнокопытных животных, которое относится к категории трансграничных инфекций [3, 11]. Возбудителем является безоболочечный РНК-содержащий вирус, принадлежащий к порядку *Picornavirales*, роду *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae* [11]. Вирус ящура характеризуется высокой антигенной изменчивостью за счет мутаций в генах капсидных белков и представлен 7 типами и множеством подтипов [11, 13].

Ящур наносит огромный экономический ущерб, который связан с затратами на ликвидацию болезни и введением строгих ограничений, налагаемых на внутреннюю и международную торговлю продукцией животноводства. Система мер для борьбы с ящуром и его

профилактики предусматривает массовую иммунизацию животных, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета [6, 13].

При репродукции в суспензионной перевиваемой клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомяка (ВНК-21/2-17) вирус ящура образует 4 варианта специфических компонентов: 146S компонент (полные частицы), состоящий из одной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида, каждая из которых представляет собой комплекс белков VP_1 - VP_2 - VP_3 - VP_4 ; 75S частицы, лишенные РНК и включающие в себя 60 копий полипептида VP_1 - VP_3 - VP_4 ; 12S компонент, состоящий из белков VP_1 , VP_2 , VP_3 ; 3,8S субъединицы, представленные неструктурным белком VP_9 [8, 10].

При производстве противоящурных вакцин большое значение имеет концентрация в исходном сырье 146S частиц, обладающих высокой иммуногенностью и устойчивостью [3, 12]. Поэтому каждую партию сырья для производства противоящурных вакцин исследуют на определение концентрации 146S компонента, применяя количественный вариант реакции связывания комплемента (РСК). Однако данный метод имеет ряд недостатков: трудоемкость и продолжительность проводимого анализа (не менее 2–3 сут), особенно при одновременном исследовании большого количества проб [1].

В связи с этим целесообразно было предложить способ определения концентрации полных частиц вируса ящура в сырье для вакцины на основе обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), который отличается высокой чувствительностью и специфичностью, является более экспрессным методом, что позволит одновременно исследовать несколько десятков проб вирусосодержащего сырья и сократить время проведения анализа до 4 ч [7, 9]. Учитывая преимущества ОТ-ПЦР-РВ по сравнению с РСК, актуально установить отрицательную линейную корреляцион-

Таблица 1

Соотношение результатов определения концентрации 146S компонента вируса ящура в РСК и величины порогового цикла амплификации в ОТ-ПЦР-РВ

$n = 3$

Исследуемый образец	Концентрация 146S компонента в РСК, мкг/см ³				Пороговый цикл амплификации ОТ-ПЦР-РВ			
	C_1	C_2	C_3	C_{cp}	C_{11}	C_{12}	C_{13}	C_{1cp}
Контрольные образцы								
Положительный контроль								
Концентрация 146S компонента:								
0,1 мкг/см ³	0,10	0,10	0,15	$0,12 \pm 0,03$ ($p < 0,005$)	29,78	29,84	29,73	$29,78 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)
0,5 мкг/см ³	0,60	0,58	0,60	$0,59 \pm 0,01$ ($p < 0,001$)	27,84	27,81	27,72	$27,79 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)
1,0 мкг/см ³	1,05	1,10	1,10	$1,08 \pm 0,03$ ($p < 0,001$)	25,78	25,84	25,86	$25,83 \pm 0,04$ ($p < 0,001$)
2,0 мкг/см ³	1,90	1,85	2,10	$1,95 \pm 0,13$ ($p < 0,005$)	22,09	22,14	22,19	$22,14 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)
3,0 мкг/см ³	3,00	2,91	3,13	$3,01 \pm 0,11$ ($p < 0,005$)	17,77	17,69	17,81	$17,76 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)
4,0 мкг/см ³	4,10	3,95	3,95	$4,00 \pm 0,09$ ($p < 0,005$)	13,66	13,6	13,74	$13,67 \pm 0,07$ ($p < 0,005$)
5,0 мкг/см ³	4,85	5,00	4,95	$4,93 \pm 0,08$ ($p < 0,005$)	9,78	9,88	9,85	$9,84 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)
Отрицательный контроль	н/о	н/о	н/о	н/о	н/в	н/в	н/в	н/в
Неинактивированный антиген для противоящурной вакцины								
Сырье для эмульсионной вакцины против ящура типа А из штамма А № 2029/Турция/2006	1,39	1,55	1,51	$1,48 \pm 0,08$ ($p < 0,01$)	23,91	23,74	23,79	$23,81 \pm 0,09$ ($p < 0,005$)
Сырье для эмульсионной вакцины против ящура типа О из штамма О № 2212/Приморский/2014	0,92	1,10	1,06	$1,03 \pm 0,09$ ($p < 0,01$)	25,91	26,16	25,99	$26,02 \pm 0,13$ ($p < 0,005$)
Сырье для эмульсионной вакцины против ящура типа Азия-1 из штамма Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011	3,31	3,09	3,27	$3,22 \pm 0,12$ ($p < 0,01$)	17,01	16,68	16,64	$16,78 \pm 0,20$ ($p < 0,005$)

н/о – 146S компонент вируса ящура не обнаружен;

н/в – геном вируса ящура не выявлен.

ную зависимость между содержанием 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины и пороговым циклом амплификации (C_t) в виде регрессионной модели. В ОТ-ПЦР-РВ значение C_t зависит от концентрации вируса ящура, в свою очередь, количество копий вирусной РНК пропорционально содержанию 146S частиц. Экспериментальное подтверждение корреляции результатов ОТ-ПЦР-РВ и РСК позволит разработать быстрый и экономичный способ определения концентрации полных вирусных частиц в сырье для вакцины.

Целью исследования была оценка возможности применения метода ОТ-ПЦР-РВ для определения концентрации 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали культуральный вирус ящура вакцинных штаммов А № 2029/Турция/2006, О № 2212/Приморский/2014, Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011, которые депонированы в Коллекцию штам-

мов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Репродукцию вируса осуществляли в суспензионной перевиваемой культуре клеток ВНК-21/2-17.

Реакция связывания комплемента (РСК). Для определения концентрации 146S компонента (в мкг/см³) применяли количественный вариант РСК с использованием антигена вируса ящура и штаммспецифических сывороток крови морских свинок на указанные выше штаммы вируса ящура [1].

Выделение РНК вируса ящура из сырья для вакцины проводили с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

ОТ-ПЦР-РВ. Обнаружение генома вируса ящура и определение концентрации 146S частиц в вирусосодержащей суспензии проводили с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Для проведения анализа использовали праймеры и TagMan ДНК-зонд, рассчитанные на высококонсервативный участок 3D-гена вируса ящура. Результаты реакции анализировали с помощью программного обеспечения Rotor-Gene 1.8.17.5, определяющего величину порогового цикла амплификации, которая об-



Рис. График корреляционной зависимости пороговых циклов амплификации и концентрации 146S компонента культурального вируса ящура ($n = 3$)

ратно пропорциональна количеству копий вирусной РНК и концентрации 146S компонента [4].

Вакцины. В работе использовали 3 эмульсионные моновалентные вакцины «АРИАХ-ВАК» против ящура типов А, О, Азия-1. Вакцина против ящура типа А, по результатам РСК, содержала 146S компонент в количестве $6,15 \pm 0,11$ мкг в дозе, против типа О – $6,03 \pm 0,12$ мкг в дозе, против типа Азия-1 – $6,43 \pm 0,12$ мкг в дозе; по данным ОТ-ПЦР-РВ, против типа А – 6,20 мкг в дозе, против типа О – 6,12 мкг в дозе, против типа Азия-1 – 6,50 мкг в дозе.

Животные. В исследовании использовали подсвинков пород ландрас и дюрок массой 30–40 кг в количестве 21 головы.

Иммунизация и контрольное заражение животных. Все животные были разделены на 3 опытные группы по 5 голов в каждой. Животных первой группы иммунизировали эмульсионной моновалентной вакциной против ящура типа А, второй – против ящура типа О, третьей – против ящура типа Азия-1. Также были сформированы 3 контрольные группы по 2 головы в каждой для контроля вируса ящура типов А, О, Азия-1. Вакцину вводили внутримышечно в верхнюю треть шеи в дозе 2 см^3 без разведения. Контрольное заражение в первой группе осуществляли адаптированным к подсвинкам гомотичным штаммом А № 2029/Турция/2006, во второй группе – штаммом О № 2212/Приморский/2014, в третьей группе – штаммом Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011 под слизистую языка в дозе $10^4 \text{ ИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ через 28 сут после иммунизации. Патологоанатомический осмотр животных проводили через 7 сут после заражения.

Определение титра антител в сыворотках крови животных после иммунизации осуществляли с помощью реакции нейтрализации в соответствии с утвержденными методическими указаниями [2].

Статистическая обработка данных. Полученные результаты обрабатывали, определяя средние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера, а также коэффициент детерминации [5]. Построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы для выявления связи между значениями концентрации 146S частиц в РСК и пороговых циклов амплификации в ОТ-ПЦР-РВ подготавливали калибровочную панель контрольных положительных образцов с содержанием РНК вируса ящура, эквивалентным следующим концентрациям 146S компонента: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг/см³, а также отрицательный контроль, представляющий собой суспензию клеток линии ВНК-21/2-17, не зараженную вирусом ящура. Из каждого образца отбирали по 2 пробы: одну – для определения величины порогового цикла амплификации (C_t) в ОТ-ПЦР-РВ, другую – для измерения концентрации 146S компонента вируса ящура (C_{146S}) в РСК. Эксперимент повторяли 3 раза. По итогам анализа получали выборки параллельно установленных значений концентрации 146S частиц и пороговых циклов амплификации, представленных в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что значения пороговых циклов амплификации для всех разведений 146S компонента вируса ящура с концентрациями от 0,1 до 5,0 мкг/см³ находились в диапазоне от $29,78 \pm 0,06$ до $9,84 \pm 0,06$ соответственно. В отрицательном контрольном образце геном вируса ящура не выявлен. На основании полученных данных была выявлена отрицательная линейная корреляционная зависимость между C_{146S} и C_t в виде регрессионной модели $C_{146S} = (30,269 - C_t) / 4,155$, представленной графиком линейной функции на рисунке. Фактический коэффициент детерминации (R^2) для данной зависимости стремится к единице и составляет 0,9891, что подтверждает высокую достоверность полученных результатов.

На следующем этапе работы проводили тестирование предложенной регрессионной модели, определяя концентрацию 146S частиц в неинaktivированном сырье для вакцин против ящура трех типов (А, О, Азия-1) с помощью метода ОТ-ПЦР-РВ.

Исследовали неинaktivированный вирусосодержащий материал для производства вакцины против ящура типа А из штамма А № 2029/Турция/2006. Пробу параллельно анализировали в трех повторениях методом ОТ-ПЦР-РВ и в РСК. Полученные результаты отражены в таблице 1, из которой следует, что значение порогового цикла амплификации составило $23,81 \pm 0,09$. В соответствии с регрессионной моделью $C_{146S} = (30,269 - C_t) / 4,155$ значение концентрации 146S компонента в данной пробе – $1,55 \pm 0,02$ мкг/см³, что соотносится с данными РСК ($1,48 \pm 0,08$ мкг/см³). Иными словами, разработанная модель с помощью метода ОТ-ПЦР-РВ позволяет оценивать содержание 146S компонента в неинaktivированном сырье для вакцины против ящура типа А.

Полученный материал инаktivировали, концентрировали в 2 раза и определяли количество 146S антигена в расчете на дозу 2 см^3 . Результаты исследования отражены в таблице 2, из которой видно, что, по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ, с учетом исходного содержания полных вирусных частиц и кратности концентрирования, количество 146S компонента в инаktivированном материале – 6,20 мкг в дозе, что соотносится с экспериментальными данными РСК ($6,15 \pm 0,11$ мкг в дозе).

Полученной моновалентной эмульсионной вакциной против ящура типа А прививали 5 подсвинков

Таблица 2

Оценка иммуногенности трех инактивированных эмульсионных моновалентных вакцин против ящура типов А, О, Азия-1

n = 5

Группа животных	Наименование вакцины	Концентрация 146S компонента вируса ящура в вакцине, мкг в дозе		Номер животного	Титр антител против вируса ящура, $\log_2$	Наличие генерализации
		РСК	по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ			
Опытная № 1	Вакцина против ящура типа А из штамма А № 2029/Турция/2006	$6,15 \pm 0,11$ ($p < 0,010$)	6,20	1	6,00	–
				2	6,25	–
				3	6,00	–
				4	6,25	–
				5	6,00	–
				$M \pm m$	$6,10 \pm 0,14$ ($p < 0,010$)	
Контрольная № 1	Не иммунизировали	–	–	6	<0,5	+
				7	<0,5	+
Опытная № 2	Вакцина против ящура типа О из штамма О № 2212/Приморский/2014	$6,03 \pm 0,12$ ($p < 0,010$)	6,12	8	6,25	–
				9	6,00	–
				10	5,75	–
				11	6,00	–
				12	5,75	–
				$M \pm m$	$5,95 \pm 0,21$ ($p < 0,010$)	
Контрольная № 2	Не иммунизировали	–	–	13	<0,5	+
				14	<0,5	+
Опытная № 3	Вакцина против ящура типа Азия-1 из штамма Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011	$6,43 \pm 0,12$ ($p < 0,010$)	6,50	15	6,25	–
				16	6,25	–
				17	6,00	–
				18	6,50	–
				19	6,25	–
				$M \pm m$	$6,25 \pm 0,18$ ($p < 0,010$)	
Контрольная № 3	Не иммунизировали	–	–	20	<0,5	+
				21	<0,5	+

Указаны значения титров антител в сыворотках крови животных, иммунизированных противоящурной вакциной без разведения.

и оценивали ее иммуногенную активность по стандартной методике. При иммунизации животных первой группы титр накопления вируснейтрализующих антител в организме животных составил $6,10 \pm 0,14 \log_2$ (табл. 2). По итогам контрольного заражения животных экспериментально доказали, что количество иммуногенных компонентов, заложенных в дозу противоящурной вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ, позволяло защитить 5 из 5 иммунизированных свиней от генерализованной формы ящура типа А. У всех контрольных животных наблюдали генерализацию ящура.

На следующем этапе работы исследовали неинaktivированный вирусосодержащий материал для вакцины против ящура типа О из штамма О № 2212/Приморский/2014 с помощью РСК и в ОТ-ПЦР-РВ с применением предложенной регрессионной модели, значение C_i для

образца составило $26,02 \pm 0,13$ (табл. 1). В соответствии с разработанной моделью $C_{146S} = (30,269 - C_i)/4,155$ концентрация 146S компонента – $1,02 \pm 0,03$ мкг/см³, что соотносится с данными РСК ($1,03 \pm 0,09$ мкг/см³). На основании этого предложенная модель с применением метода ОТ-ПЦР-РВ позволяет оценивать содержание 146S компонента в неинaktivированном антигене для вакцины против ящура типа О.

Полученный материал инактивировали, концентрировали в 3 раза и определяли количество 146S антигена в дозе вакцины 2 см³. Результаты исследования представлены в таблице 2, из которой следует, что по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ, с учетом содержания полных вирусных частиц и кратности концентрирования, содержание 146S компонента – 6,12 мкг в дозе, что соотносится с данными РСК ($6,03 \pm 0,12$ мкг в дозе).

Изготовленной эмульсионной моновалентной вакциной против ящура типа О вакцинировали 5 свиней. В результате иммунизации животных второй группы титр накопления вируснейтрализующих антител составил $5,95 \pm 0,21 \log_2$ (табл. 2). Проведя контрольное заражение животных, доказали, что количество иммуногенных компонентов, заложенных в дозу противоящурной вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ, позволяет защитить 5 из 5 иммунизированных свиней от генерализованной формы ящура типа О. У всех контрольных животных отмечали генерализацию заболевания.

Далее с помощью ОТ-ПЦР-РВ с использованием разработанной регрессионной модели и РСК исследовали неинактивированный вирусосодержащий материал для изготовления вакцины против ящура типа Азия-1 из штамма Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011. Величина порогового цикла амплификации для пробы составила $16,78 \pm 0,20$ (табл. 1). В соответствии с регрессионной моделью вида $C_{146S} = (30,269 - C_f)/4,155$ концентрация 146S компонента равна $3,25 \pm 0,05$ мкг/см³, что соотносится с результатами РСК ($3,22 \pm 0,12$ мкг/см³). Таким образом, предложенная модель с использованием метода ОТ-ПЦР-РВ дает возможность определять содержание 146S компонента в неинактивированном сырье для вакцины против ящура типа Азия-1.

Полученный материал инактивировали и оценивали количество 146S антигена в дозе 2 см³. Результаты исследования представлены в таблице 2, в которой указано, что, по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ, с учетом исходного содержания полных вирусных частиц и кратности концентрирования, содержание 146S компонента – 6,50 мкг в дозе, что согласуется с результатами РСК ($6,43 \pm 0,12$ мкг в дозе).

Полученную эмульсионную моновалентную вакцину использовали для иммунизации 5 подсосунков. При иммунизации животных третьей группы титр накопления противоящурных антител составил $6,25 \pm 0,18 \log_2$ (табл. 2). Проведя контрольное заражение животных, доказали, что количество 146S компонента, определенное в ОТ-ПЦР-РВ с помощью регрессионной модели и заложенное в дозу противоящурной вакцины, позволяет защитить 5 из 5 иммунизированных свиней от генерализованной формы ящура типа Азия-1. У всех контрольных животных наблюдали генерализацию ящура.

Таким образом, способ определения концентрации 146S компонента методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием регрессионной модели $C_{146S} = (30,269 - C_f)/4,155$ является надежным и быстрым. Тест-система для выявления вакцинных штаммов вируса ящура высокочувствительна и обеспечивает высокую корреляцию (95,5–99,0%) с результатами РСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к определению концентрации 146S частиц в сырье для вакцины против ящура разных типов с применением метода ОТ-ПЦР-РВ и разработанной на его основе регрессионной модели. По результатам РСК и ОТ-ПЦР-РВ между содержанием 146S компонента и пороговым циклом амплификации выявлена отрицательная корреляционная зависимость в виде регрессии, представленной графиком линейной функции $C_{146S} = (30,269 - C_f)/4,155$. В ОТ-ПЦР-РВ значение порогового цикла зависит от концентрации РНК вируса ящура, в свою очередь, количество копий вирусной РНК пропорционально содержанию 146S час-

тиц. Экспериментальное подтверждение корреляции результатов ОТ-ПЦР-РВ и РСК позволило разработать быстрый и экономичный способ определения концентрации полных вирусных частиц в сырье для вакцины.

В результате исследования было доказано, что количество 146S компонента, определенного в ОТ-ПЦР-РВ с помощью предложенной регрессионной модели и заложенного в прививную дозу противоящурной вакцины, позволяет защитить вакцинированных животных от генерализованной формы ящура типов А, О, Азия-1.

Метод ОТ-ПЦР-РВ является высокочувствительным, позволяет быстро и с высокой степенью достоверности оценивать концентрацию 146S антигена в противоящурной вакцине. Предложенный способ определения количества 146S частиц является надежным и характеризуется высокой корреляцией (95,5–99,0%) данных с результатами РСК.

Показано, что данный способ можно применять для определения содержания 146S компонента культурального вируса ящура в сырье для вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. – Суздаль, 1994. – 92 с.
2. Методические указания по постановке реакции нейтрализации для определения иммунного статуса животных при ящуре: утв. МСХ СССР 26.12.1983.
3. Пономарев А. П., Узюмов В. Л., Груздев К. Н. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. – Владимир: Фолиант, 2006. – 250 с.
4. Применение ОТ-ПЦР-РВ для определения концентрации 146S компонента вируса ящура типов О/Саудовская Аравия и Asia-1/Shamir в полуфабрикате вакцины / Д. А. Лозовой, А. А. Шишкова, Д. В. Михалишин [и др.] // Ветеринария. – 2017. – № 6. – С. 57–61.
5. Статистические методы анализа в клинической практике / П. О. Румянцев, В. А. Саенко, У. В. Румянцева, С. Ю. Чекин. – Обнинск: ГУ РМНЦ РАМН. – 46 с. – URL: <http://www.kantiana.ru/medicinal/help/StatMethodsInClinics.pdf>.
6. Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report. – Pirbright, 2007. – URL: http://www.wrlfmd.org/ref_labs/fmd_ref_lab_reports.htm.
7. Enhanced laboratory diagnosis of foot and mouth disease by real-time polymerase chain reaction / A. E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King [et al.] // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2004. – Vol. 23, No. 3. – P. 1003–1009.
8. Cartwright B., Chapman W. G., Brown F. Serological and immunological relationships between the 146S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus // J. Gen. Virol. – 1980. – Vol. 50, No. 2. – P. 369–375.
9. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease / A. E. Shaw, S. M. Reid, K. Ebert [et al.] // J. Virol. Methods. – 2007. – Vol. 143, No. 1. – P. 81–85. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.02.009>.
10. Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases // Diseases of Swine / ed. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Alaire, D. J. Taylor. – 9th ed. – Ames, Iowa, 2006. – P. 517–536.
11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals / OIE. – 7th ed. – Paris, France, 2012. – Vol. 1, Chap. 2.1.5. – P. 166–169.
12. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease / S. Alexandersen, Z. Zhang, A. I. Donaldson, A. J. M. Garland // J. Comp. Pathol. – 2003. – Vol. 129, No. 1. – P. 1–36.
13. Wernike K., Beer M., Hoffmann B. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus, influenza A virus and classical swine fever virus by high-speed real-time RT-PCR // J. Virol. Methods. – 2013. – Vol. 193, No. 1. – P. 50–54. – DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.05.005.

Поступила 20.03.18

Принята в печать 19.04.18

METHOD FOR FMD VIRUS 146S COMPONENT CONCENTRATION DETERMINATION WITH REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION – POLYMERASE CHAIN REACTION IN VACCINE RAW MATERIALS

M. I. Doronin¹, A. M. Timina², D. A. Lozovoy³, V. A. Starikov⁴, D. V. Mikhlishin⁴, N. N. Medvedeva⁶, A. V. Borisov⁷

¹ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: doronin@arriah.ru

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

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

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

⁵ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: mikhlishindv@arriah.ru

⁶ Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: medvedeva@arriah.ru

⁷ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: borisov@arriah.ru

SUMMARY

Method for determination of foot-and-mouth disease (FMD) virus 146S component concentration with real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (rtRT-PCR) in vaccine raw materials is developed. Negative regression model of $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$ type allowing determination of FMDV 146S particle concentrations based on the amplification threshold cycle values (C_t) is proposed. It has been experimentally proven that the quantity of the 146S component determined by the real-time RT-PCR method using developed regression model and contained in the inoculation dose of FMD vaccine confers protection to the vaccinated animals against generalized FMD of A, O, Asia-1 types. rtRT-PCR method is highly sensitive and allows rapid and highly reliable estimation of the 146S antigen concentration in FMD vaccine. The method for 146S particle quantity determination by real-time RT-PCR using the regression model is reliable and demonstrates high correlation (95.5–99.0%) with the complement fixation test results.

Key words: foot-and-mouth disease (FMD) virus, concentration of 146S component, rtRT-PCR, amplification threshold cycle.

INTRODUCTION

Foot-and-mouth disease is a highly contagious vesicular virus disease of cloven-hooved animals that is classified to transboundary infections [3, 11]. The agent is a non-enveloped RNA-virus that belongs to *Picornavirales* order, *Aphthovirus* genus of *Picornaviridae* family [11]. FMD virus is highly antigenically variable due to mutations in capsid protein genes and has 7 types and various subtypes [11, 13].

FMD causes huge economic losses associated with costs for the disease eradication and stringent measures imposed on domestic and international trade in animal products. Complex measures for FMD prevention and control include mass immunization of animals as well as control of postvaccinal immunity level [6, 13].

FMD virus forms 4 variants of its specific components when it is reproduced in suspension continuous baby hamster kidney cell line (BHK-21/2-17): 146S component (whole particles) containing one viral RNA molecule and 60 polypeptide copies, each is a complex of VP₁-VP₂-VP₃-

VP₄ proteins; 75S particles lacking RNA and comprising 60 copies of VP₁-VP₃-VP₀ polypeptide; 12S component consisting of VP₁, VP₂, VP₃ proteins; 3.85S subunits represented by non-structural VP₀ protein [8, 10].

Concentration of highly immunogenic and resistant 146S particles in raw materials is of great importance for FMD vaccine production [3, 12]. Therefore, each batch of FMD vaccine raw materials is tested by quantitative complement fixation test (CFT) to determine 146S component concentration. However, this method has some disadvantages: it is labour and time consuming (test duration is at least 2-3 days) especially when many samples are tested simultaneously [1].

Therefore, it is reasonable to propose a real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (rtRT-PCR)-based method for determination of FMDV whole particle concentrations in vaccine raw materials that is highly sensitive and specific and more rapid that will allow simultaneous testing of several dozens of virus-containing raw

Table 1
Correlation between FMDV 146S component concentrations determined by CFT
and amplification threshold cycle values determined by rtRT-PCR
 n=3

Tested sample	146S component concentrations determined by CFT, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$				Amplification threshold cycle values determined by rt RT-PCR			
	C_1	C_2	C_3	C_{mean}	C_{t1}	C_{t2}	C_{t3}	$C_{t\text{mean}}$
Контрольные образцы								
Positive control								
146S component concentration:								
0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	0.10	0.10	0.15	0.12 ± 0.03 ($p < 0.005$)	29.78	29.84	29.73	29.78 ± 0.06 ($p < 0.005$)
0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	0.60	0.58	0.60	0.59 ± 0.01 ($p < 0.001$)	27.84	27.81	27.72	27.79 ± 0.06 ($p < 0.005$)
1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	1.05	1.10	1.10	1.08 ± 0.03 ($p < 0.001$)	25.78	25.84	25.86	25.83 ± 0.04 ($p < 0.001$)
2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	1.90	1.85	2.10	1.95 ± 0.13 ($p < 0.005$)	22.09	22.14	22.19	22.14 ± 0.05 ($p < 0.005$)
3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	3.00	2.91	3.13	3.01 ± 0.11 ($p < 0.005$)	17.77	17.69	17.81	17.76 ± 0.06 ($p < 0.005$)
4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	4.10	3.95	3.95	4.00 ± 0.09 ($p < 0.005$)	13.66	13.6	13.74	13.67 ± 0.07 ($p < 0.005$)
5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	4.85	5.00	4.95	4.93 ± 0.08 ($p < 0.005$)	9.78	9.88	9.85	9.84 ± 0.06 ($p < 0.005$)
Negative control	n/f	n/f	n/f	n/f	n/d	n/d	n/d	n/d
Non-inactivated antigen for anti-FMD vaccine								
raw material for emulsion vaccine against type A FMD based on A No. 2029/Turkey/2006 strain	1.39	1.55	1.51	1.48 ± 0.08 ($p < 0.01$)	23.91	23.74	23.79	23.81 ± 0.09 ($p < 0.005$)
raw material for emulsion vaccine against type O FMD based on O No. 2212/Primorsky/2014 strain	0.92	1.10	1.06	1.03 ± 0.09 ($p < 0.01$)	25.91	26.16	25.99	26.02 ± 0.13 ($p < 0.005$)
raw material for emulsion vaccine against type Asia-1 FMD based on Asia-1 No. 2145/Tajikistan/2011 strain	3.31	3.09	3.27	3.22 ± 0.12 ($p < 0.01$)	17.01	16.68	16.64	16.78 ± 0.20 ($p < 0.005$)

n/f – 146S component of FMD virus was not found;
 n/d – FMD virus genome was not detected.

material samples and reduce testing time to 4 hours [7, 9]. Considering rtRT-PCR advantages as compared to CFT a negative linear correlation between FMDV 146S component quantity in vaccine raw materials and amplification threshold cycle values (C_t) is to be established in the form of regression model. As for rtRT-PCR, C_t value depends on FMDV RNA concentration and number of viral RNA copies is proportional to number of 146S particles. Experimental demonstration of correlation between rtRT-PCR and CFT results will enable development of rapid and cost-effective method for determination of whole virus particle concentrations in vaccine raw material.

The study was aimed at assessment of potential rtRT-PCR use for determination of FMDV 146S component concentration in vaccine raw materials.

MATERIALS AND METHODS

Virus. Culture FMDV A No. 2029/Turkey/2006, O No. 2212/Primorsky/2014, Asia-1 No. 2145/Tajiki-

stan/2011 vaccine strains deposited to the FGBI "ARRIAH" Collection of Microorganism Strains were used. The virus was reproduced in suspension continuous BHK-21/2-17 cell culture.

Complement fixation test (CFT). Quantitative CFT variant with FMDV antigen and strain-specific guinea pig sera against the above-said FMDV strains was used for determination of 146S component concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) [1].

RNA extraction from the vaccine raw materials was performed with commercial RIBO-sorb kit (FBSE "Central Research Institute of Epidemiology" of the Rospotrebnadzor) in accordance with manufacturer's instructions.

rtRT-PCR. Real-time RT-PCR was used for detection of FMD virus genome and determination of 146S particle concentration in the virus-containing suspension. Primers and TaqMan DNA probe designed for highly conservative segment of FMDV 3D-gene were used for analysis. The reaction results were analyzed using Rotor-Gene 1.8.17.5 software that determines amplification threshold value that is reciprocal to number of viral RNA copies and 146S component concentration [4].

Vaccines. Three emulsion monovalent ARRIAH-VAC vaccines against type A, O, Asia-1. FMD virus were used. The vaccine against type A FMDV contained $6.15 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{dose}$, vaccine against type O FMDV contained $6.03 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{dose}$ and vaccine against Asia-1 FMDV contained $6.43 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{dose}$ of 146S component as determined by CFT; and rtRT-PCR-determined concentration of 146S component was $6.20 \mu\text{g}/\text{dose}$ in vaccine against type A FMDV, $6.12 \mu\text{g}/\text{dose}$ in vaccine against type O FMDV and $6.50 \mu\text{g}/\text{dose}$ in vaccine against Asia-1 FMDV.

Animals. Twenty-one Landrace and Duroc gilts weighing 30–40 kg were used.

Immunization and challenging of animals. All animals were divided into 3 test groups, 5 gilts per group. Animals of test group 1 were immunized with emulsion monovalent vaccine against type A FMD, animals of test group 2 were immunized with the vaccine against type O FMD and animals of test group 3 were immunized with the vaccine against type Asia-1 FMD. Three control groups, 2 animals per group, were formed for type A, O, Asia-1 FMDV, respectively. The non-diluted vaccine was injected intramuscularly at a dose of 2 cm^3 in the upper third of neck. Animals of test group 1, test group 2 and test group 3 were challenged with gilt-adapted homologous FMDV A No. 2029/Turkey/2006, O No. 2212/Primorsky/2014 and Asia-1 No. 2145/Tajikistan/2011 strains, respectively. The said virus strains were injected at a dose of $10^4 \text{ ID}_{50}/0.2 \text{ cm}^3$ in tongue mucosa 28 days after immunization. The animals were subjected to postmortem examination 7 days after challenge.

Determination of antibody titres in animal sera after immunization was performed with neutralization test in accordance with approved guidelines [2].

Statistical data processing. Obtained results were processed and arithmetical mean, confidence level for statistical difference between mean values determined with differential Student's-Fischer test as well as determination coefficient were identified [5]. Diagrams were constructed using Microsoft Excel 2010 software application package.

RESULTS AND DISCUSSION

At the first stage a calibration panel of control positive samples containing amounts of FMDV RNA equivalent to the following 146S component concentrations: 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ as well as negative control that was BHK-21/2-17 cell suspension not infected with FMDV were prepared to identify correlation between 146S component concentrations determined by CFT and amplification threshold cycle values determined with rtRT-PCR. Two specimens were taken from each sample: one – for amplification threshold cycle value (C_t) determination with rtRT-PCR and the other one – for estimation of FMDV 146S component concentration (C_{146S}) with CFT. The experiment was repeated thrice. Parallely determined 146S particle concentrations and amplification threshold cycle values were selected based on the analysis results (Table 1).

Table 1 shows that amplification threshold cycle values for all dilutions of FMDV 146S component at concentration of 0.1–5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ were in the range of 29.78 ± 0.06 – 9.84 ± 0.06 , respectively. No FMD virus genome was detected in negative control sample. Based on the obtained data negative linear correlation between C_{146S} and C_t was identified as a $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$ regression model plotted as linear function in Figure. Actual determination coefficient (R^2) for the said correlation tends

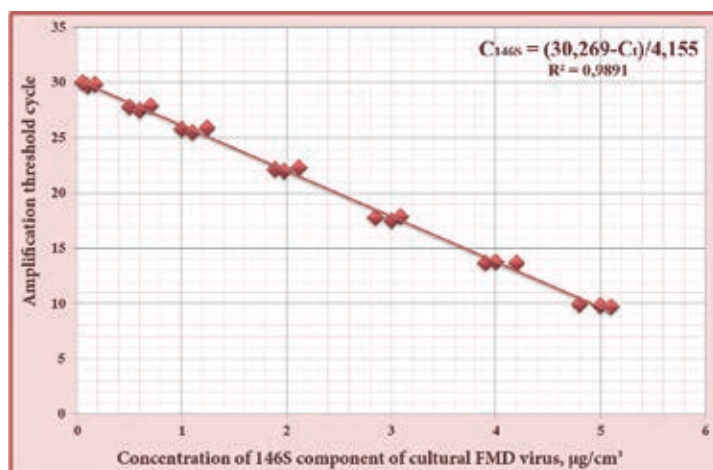


Fig. Graph of correlation between amplification threshold values and cultured FMDV 146S component concentrations ($n=3$)

to 1 and is 0.9891 that indicates high reliability of the obtained results.

At the next stage proposed regression model was tested by determining 146S particle concentrations in non-inactivated raw materials for vaccines against FMDV of three types (A, O, Asia-1) with rtRT-PCR method.

Non-inactivated virus-containing material intended for production of type A FMD vaccine based on A No. 2029/Turkey/2006 was tested. The specimen was parallely tested in triplicate with rtRT-PCR and CFT. Obtained results given in Table 1 show that amplification threshold cycle value was 23.81 ± 0.09 . In accordance with regression model $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$ 146S component concentration in the given specimen was $1.55 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ that correlated to the CFT results ($1.48 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). In other words, developed model based on rtRT-PCR method allows estimation of 146S component quantity in non-inactivated raw material for vaccine against type A FMD.

Prepared material was inactivated, concentrated twice and 146S antigen quantity was estimated per dose (2 cm^3). Test results are given in Table 2 and show that 146S component quantity in inactivated material theoretically estimated based on rtRT-PCR results considering initial whole virus particle quantity and concentration factor was $6.20 \mu\text{g}$ per dose that correlated with experimental CFT results ($6.15 \pm 0.11 \mu\text{g}$ per dose).

Prepared monovalent emulsion vaccine against type A FMD was used for inoculation of 5 gilts and tested for its immunogenicity according to standard procedure. Neutralizing antibody titre in immunized animals of test group 1 was $6.10 \pm 0.14 \log_2$ (Table 2). Animal challenge test results evidences that quantity of immunogenic components contained in a FMD vaccine dose and determined by regression model-rtRT-PCR protects 5 out of 5 immunized pigs from generalized type A FMD. All control animals demonstrated generalized FMD form.

At the next stage non-inactivated virus-containing material intended for production of type O FMD vaccine based on O No. 2212/Primorsky/2014 was tested with CFT and rtRT-PCR using proposed regression model; C_t value for the sample was 26.02 ± 0.13 (Table 1). Based on the developed $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$ model 146S component concentration was $1.02 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ that was consistent to CFT results ($1.03 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Therefore, proposed

Table 2
Tests of three inactivated emulsion monovalent type A, O, Asia-1 FMD vaccines for their immunogenicity
 n=5

Group of animals	Name of vaccine	Concentration of FMDV 146S component in a vaccine, µg/dose		Animal number	Anti-FMDV antibody titre, log ₂	Presence of generalized disease
		CFT	Theoretically estimated based on rtRT-PCR results			
Test group No. 1	Type A FMD vaccine based on A No. 2029/Turkey/2006	6.15 ± 0.11 (<i>p</i> < 0.010)	6.20	1	6.00	–
				2	6.25	–
				3	6.00	–
				4	6.25	–
				5	6.00	–
				<i>M</i> ± <i>m</i>	6.10 ± 0.14 (<i>p</i> < 0.010)	
Control group No. 1	not immunized	–	–	6	<0.5	+
				7	<0.5	+
Test group No. 2	Type O FMD vaccine based on O No. 2212/Primorsky/2014	6.03 ± 0.12 (<i>p</i> < 0.010)	6.12	8	6.25	–
				9	6.00	–
				10	5.75	–
				11	6.00	–
				12	5.75	–
				<i>M</i> ± <i>m</i>	5.95 ± 0.21 (<i>p</i> < 0.010)	
Control group No. 2	not immunized	–	–	13	<0.5	+
				14	<0.5	+
Test group No. 3	Type Asia-1 FMD vaccine based on Asia-1 No. 2145/Tajikistan/2011	6.43 ± 0.12 (<i>p</i> < 0.010)	6.50	15	6.25	–
				16	6.25	–
				17	6.00	–
				18	6.50	–
				19	6.25	–
				<i>M</i> ± <i>m</i>	6.25 ± 0.18 (<i>p</i> < 0.010)	
Control group No. 3	not immunized	–	–	20	<0.5	+
				21	<0.5	+

Antibody titres in sera of animals immunized with not-diluted FMD vaccine are indicated.

model based on rtRT-PCR allows estimation of 146S component quantity in non-inactivated antigen intended for type O FMD vaccine production.

Prepared material was inactivated, concentrated thrice and 146S antigen quantity was estimated in a dose of 2 cm³. Test results are given in Table 2 and show that quantity of 146S component in inactivated material theoretically estimated based on rtRT-PCR results considering initial whole virus particle quantity and concentration fac-

tor was 6.12 µg per dose that correlated with CFT results (6.03 ± 0.12 µg per dose).

Prepared emulsion monovalent vaccine against type O FMD was used for inoculation of 5 pigs. Neutralizing antibody titre in immunized animals of test group 2 was 5.95 ± 0.21 log₂ (Table 2). Results of animal challenge test evidenced that quantity of immunogenic components contained in a FMD vaccine dose and determined by rtRT-PCR protected 5 out of 5 immunized pigs from

generalized type O FMD. All control animals demonstrated generalized FMD.

Then, non-inactivated virus-containing material intended for production of type Asia-1 FMD vaccine based on Asia-1 No. 2145/Tajikistan/2011 was tested with CFT and rtRT-PCR using proposed regression model. Amplification threshold value (C_t) for the sample was 16.78 ± 0.20 (Table 1). According to developed $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$ model 146S component concentration was $3.25 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ that was consistent to CFT results ($3.22 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Thus, proposed model based on rtRT-PCR method allows estimation of 146S component quantity in non-inactivated raw materials intended for type Asia-1 FMD vaccine production.

Prepared material was inactivated and 146S antigen quantity was estimated in a dose of 2 cm^3 . Test results are given in Table 2 and show that quantity of 146S component in inactivated material theoretically estimated based on rtRT-PCR results considering initial whole virus particles content and concentration factor was $6.50 \mu\text{g}$ per dose that correlated with CFT results ($6.43 \pm 0.12 \mu\text{g}$ per dose).

Prepared emulsion monovalent vaccine was used for inoculation of 5 gilts. Neutralizing antibody titre in immunized animals of test group 3 was $6.25 \pm 0.18 \log_2$ (Table 2). Results of animal challenge test evidenced that regression-model-rtRT-PCR-determined quantity of immunogenic components contained in a FMD vaccine dose protected 5 out of 5 immunized pigs from generalized type Asia-1 FMD. All control animals demonstrated generalized FMD.

Thus, rtRT-PCR using $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$ regression model is a reliable and rapid method for 146S component concentration determination. Test system for detection of vaccine FMDV strains was highly sensitive and demonstrated high correlation (95.5–99.0%) with CFT results.

CONCLUSION

New approach to the determination of 146S component concentration with rtRT-PCR method and regression model developed based on the said method in raw materials for vaccines against FMD was proposed. Based on CFT and rtRT-PCR results, negative correlation between 146S component quantity and amplification threshold value was identified in the form of regression and plotted as a linear function graph, $C_{146S} = (30.269 - C_t)/4.155$. As for rtRT-PCR, threshold value depends on FMDV RNA concentration and number of viral RNA copies is proportional to 146S component content. Experimental evidence of correlation between CFT and rtRT-PCR results allowed development of rapid and cost-effective method for determination of whole virus particle concentration in vaccine raw materials.

The testing indicated that 146S component quantity determined with rtRT-PCR using proposed regression model and contained in an inoculation dose of FMD vaccine protected vaccinated animals from generalized type A, O, Asia-1 FMD.

rtRT-PCR method is highly sensitive and allows rapid and highly reliable determination of 146S antigen concentration in FMD vaccine. Proposed method for 146S particle quantity determination is reliable and demonstrates high correlation (95.5–99.0%) with CFT results.

It is shown that the said method can be used for determination of cultural FMDV 146S component quantity in vaccine raw material.

REFERENCES

1. Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical assay of virus proteins [Kachestvennyj i kolichestvennyj immunohimicheskij analiz virusnyh belkov]. Suzdal, 1994 (in Russian).
2. Methodical instructions on neutralization test procedure for determination of immune status of animals with regard to FMD [Metodicheskie ukazaniya po postanovke reakcii nejtralizacii dlja opredeleniya immunnogo statusa zhivotnyh pri jashhure]: approved by USSR Ministry of Agriculture on 26.12.1983 (in Russian).
3. Ponomarev A. P., Uzyumov V. L., Gruzdev K. N. Foot-and-mouth disease virus: structure, biological and physical and chemical properties [Virus jashhura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svoystva]. Vladimir: Foliant, 2006 (in Russian).
4. Lozovoy D. A., Shishkova A. A., Mikhailishin D. V. et al. Real-time RT-PCR for determination of concentration of 146S component of FMD virus types O/Saudi Arabia and Asia-1/Shamir in semi-finished vaccine [Primenenie OT-PCR-RV dlya opredeleniya koncentracii 146S komponenta virusa yashchura tipov O/Saudovskaya Araviya i Asia-1/Shamir v polufabrikate vakciny]. *Veterinariya*. 2017; 6: 57–61 (in Russian).
5. Remyantzev P. O., Sayenko V. A., Remyantzeva U. V., Chekin S. Yu. Statistical analysis methods in clinical practice [Statisticheskie metody analiza v klinicheskoy praktike]. Obninsk: GU MRRC RAMS. URL: <http://www.kantiana.ru/medicinal/help/StatMethod-slnClinics.pdf> (in Russian).
6. Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report. Pirbright, 2007. URL: http://www.wrlfmd.org/ref_labs/fmd_ref_lab_reports.htm.
7. Shaw A. E., Reid S. M., King D. P. et al. Enhanced laboratory diagnosis of foot and mouth disease by real-time polymerase chain reaction. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2004; 23 (3): 1003–1009.
8. Gartwright B., Brown F., Chapman W. G. Serological and immunological relationships between the 146S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 1980; 50: 369–375.
9. Shaw A., Reid S. M., Ebert K. et al. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods*. 2007; 143(1): 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.02.009>.
10. Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases. *Diseases of Swine*. ed. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor. 9th ed. Ames, Iowa; 2006: 517–536.
11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol. 1. 7th ed. Paris, France: OIE; 2012; Chapter 2.1.5: 166–169.
12. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. I., Garland A. J. M. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.* 2003; 129: 1–36. DOI: 10.1016/S0021-9975(03)00041-0.
13. Wernike K., Beer M., Hoffmann B. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus, influenza A virus and classical swine fever virus by high-speed real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*. 2013; 193(1): 50–54. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.05.005.

Submitted on 20.03.18

Approved for publication on 19.04.18

УДК 619:616.98:578.835.2(470)

DOI 10.29326/2304-196X-2018-2-25-36-41

ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА РИСКА ЗАНОСА ЯЩУРА НА ТЕРРИТОРИЮ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ИЗ НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ГОСУДАРСТВ

В. М. Гуленкин¹, А. К. Караулов², Д. А. Лозовой³, В. М. Захаров⁴¹Заведующий сектором, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: gulenkin@arriah.ru²Руководитель ИАЦ, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: karaulov@arriah.ru³Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: lozovoy@arriah.ru⁴Главный эксперт, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: zaharov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлена прогностическая оценка возможных рисков заноса ящура из пограничных или сопредельных неблагополучных государств на территорию восьми федеральных округов Российской Федерации. Количественные показатели рисков были определены экспертами, специалистами в области эпизоотологии ящура. Для реализации метода экспертного опроса были определены наиболее значимые пути заноса инфекции на территорию России. По каждому из федеральных округов экспертами была определена балльная оценка риска заноса ящура рассмотренными путями. В результате статистического анализа наибольшая вероятность была определена для Дальневосточного федерального округа. Далее по значимости идут Северо-Кавказский и Сибирский федеральные округа. Исходя из полученных данных, определены основные направления заноса ящура на территорию страны. Для предотвращения возникновения и распространения ящура в зонах риска его заноса, на территории страны проводится профилактическая вакцинация восприимчивого поголовья животных. В результате ее реализации в перечисленных субъектах Российской Федерации с целью недопущения вспышек ящура необходимо создать защитный иммунитет у крупного рогатого скота не менее чем у 81% привитых животных, а среди свиней – не менее чем у 95% привитого поголовья.

Ключевые слова: ящур, эпизоотическая ситуация, экспертные оценки, риск заноса, противоэпизоотические мероприятия.

UDC 619:616.98:578.835.2(470)

EXPERT RISK ASSESSMENT OF FMD INTRODUCTION TO THE RUSSIAN FEDERATION FROM INFECTED COUNTRIES

V. M. Gulenkin¹, A. K. Karaulov², D. A. Lozovoy³, V. M. Zakharov⁴¹Head of the Unit, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: gulenkin@arriah.ru²Head of the Information and Analysis Centre, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: karaulov@arriah.ru³Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: lozovoy@arriah.ru⁴Chief Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: zaharov@arriah.ru

SUMMARY

Predictive assessment of possible risks of FMD introduction from neighboring countries to the territory of eight RF Federal Districts was presented. The risk quantitative parameters were determined by experts, specialists in the field of FMD epidemiology. To implement the expert survey method most significant routes of infection introduction to the RF were determined. The experts performed FMD introduction risk assessment for each federal district and determined its score. As a result of statistical analysis the greatest probability was determined for the Far-Eastern Federal District. The North Caucasus and Siberian Federal Okrugs demonstrate lower probability. Basing on the obtained data the major routes of FMD introduction to the territory of the country were determined. Preventive vaccination of susceptible animal population is carried out in order to prevent FMD occurrence and spread in the zones at risk of its introduction. It is aimed at FMD outbreak prevention in the specified RF Subjects by inducing protective immunity in at least 81% of immunized cattle and at least 95% of immunized pigs.

Key words: FMD, epidemic situation, expert assessment, introduction risk, anti-epidemic measures.

4) инфицированными (больными) мигрирующими дикими животными из пограничных государств;

5) сезонными рабочими, туристами, имевшими контакт с инфицированным поголовьем или продукцией животного происхождения;

6) аэрогенным переносом вируса из очагов инфекции неблагополучных/эндемичных стран на территорию России вблизи пограничных населенных пунктов;

7) заражение ящуром российских восприимчивых животных при контакте с больными животными (вирусоносителями) на общих пастбищах/водопоях между пограничными странами;

8) с контаминированным вирусом транспортом, оборудованием, инвентарем, упаковочными изделиями.

Исходя из представленного перечня возможных путей заноса ящура из пограничных/сопредельных неблагополучных государств в субъекты федеральных округов РФ, была составлена балльная оценка их реализации, где каждому возможному пути заноса ставилась оценка (количество баллов) от 0 до 10. Вероятность реализации каждого пути заноса ящура на территорию федеральных округов увеличивалась по мере повышения количественной балльной оценки. В опросе приняли участие 13 научных сотрудников ФГБУ «ВНИИЗЖ», которые являются специалистами – экспертами в области изучения ящура по различным направлениям: эпизоотология, вирусология, диагностика, биотехнология. Были оценены риски реализации вышеперечисленных путей заноса инфекции по каждому из восьми федеральных округов с использованием разработанной методики экспертных оценок [3]. Каждый эксперт ($N = 1 \dots 13$) по представленным федеральным округам ($i = 1 \dots 8$) для каждого пути заноса ящура ($j = 1 \dots 8$) на его территорию ставил соответствующую балльную оценку его реализации ($x_{i,j}$). В качестве вероятностной характеристики реализации полученных оценок по группе экспертов была принята следующая шкала средних оценочных значений [7]:

$$\bar{X}_{i,j} = (\sum_{n=1}^{13} x_{i,j}) / 13 \quad \text{для } i, j = 1 \dots 8.$$

Если $\bar{X}_{i,j} \leq 3$ – слабый риск реализации пути заноса;

$3 < \bar{X}_{i,j} \leq 5$ – умеренный риск реализации;

$5 < \bar{X}_{i,j} \leq 7$ – заметный риск реализации;

$7 < \bar{X}_{i,j} \leq 9$ – высокий риск реализации;

$\bar{X}_{i,j} > 9$ – очень высокий риск реализации.

В таблице приведена средняя балльная оценка группой экспертов риска реализации различных возможных путей заноса ящура на территорию федеральных округов РФ.

Наибольшее влияние рассмотренных путей на занос инфекции из неблагополучных пограничных стран на территорию Российской Федерации по совокупности ответов всех экспертов было получено для Дальневосточного федерального округа, где существует высокая значимость реализации четырех путей заноса ящура: высокая вероятность заноса инфекции путем нелегального ввоза инфицированного (в инкубационном периоде/переболевшего) скота из пограничных неблагополучных государств и продукции животного происхождения, полученной от больного/переболевшего ящуром скота. Существует заметный риск реализации заноса ящура при ввозе контаминированных вирусом кормов, продукции животного происхождения, а также инфицированными (переболевшими) мигрирующими дикими животными.

Для Сибирского федерального округа высока возможность заноса инфекции путем нелегального ввоза инфицированного (в инкубационном периоде/переболевшего) скота из пограничных неблагополучных государств, заметная вероятность заноса ящура инфицированными (переболевшими) мигрирующими дикими животными и с продукцией животного происхождения, полученной от больного/переболевшего ящуром скота.

Северо-Кавказский и Южный федеральные округа имеют высокую значимость заноса инфекции путем нелегального ввоза инфицированного (в инкубационном периоде/переболевшего) скота из пограничных неблагополучных государств и заметную вероятность с продукцией животного происхождения, полученной от больного/переболевшего ящуром скота. Помимо этого, для Северо-Кавказского федерального округа признана заметной реализация заноса инфекции при контакте с больными или переболевшими животными на имеющихся общих пастбищах или водопоях между пограничными государствами.

Для Уральского и Приволжского федеральных округов признана заметной реализация заноса инфекции путем нелегального ввоза инфицированных/переболевших животных из неблагополучных пограничных или сопредельных государств.

По всем федеральным округам были получены приведенные значения реализации события (Y_i), как «вероятность заноса ящура» при общей совокупности действия всех рассмотренных путей заноса инфекции на их территорию. Данная величина вычислялась по формуле

$$Y_i = (\sum_{j=1 \dots 8} \bar{X}_{i,j}) / 80 \quad \text{для } i = 1 \dots 8.$$

То есть складывались полученные средние значения баллов по всем рассмотренным путям заноса ящура для каждого федерального округа (суммы значений по каждой строке), и полученная сумма делилась на максимально возможное допустимое значение, равное 80 баллам. Из приведенных в таблице результатов видно, что наибольшая вероятность заноса инфекции определена для территории Дальневосточного федерального округа, который граничит с Китаем, являющимся неблагополучным по ящуру. За последнее десятилетие ящур в крае появлялся в течение двух лет. Частота годовой реализации события составляет 0,2 (2/10) и говорит о том, что по крайней мере одно событие может произойти в течение ближайших 5 лет [1].

Остается достаточно высокой вероятностью заноса ящура для Сибирского федерального округа, где за последние 10 лет (2009–2018 гг.) на территории Забайкальского края ящур регистрировался в течение 7 лет. То есть соответствующая количественная оценка вероятности реализации события за один год составит порядка 0,7 (7/10), что по классификации МЧС РФ [1] означает, что «событие произойдет наверняка» (вспышка ящура будет наверняка), а ее воздействие (распространение) затронет один или несколько регионов.

Следующими по опасности заноса ящура являются Северо-Кавказский и Южный федеральные округа, территория которых сопредельна с такими неблагополучными по ящуру странами, как Турция и Иран. За указанный период наблюдения на их территории ящур был зарегистрирован один раз в 2013 г. Исходя

Таблица
Результаты оценки экспертной группы

№ п/п	Федеральный округ	Средняя балльная оценка возможных путей заноса ящура на территорию федеральных округов РФ ($\bar{X}_{i,j}$) из неблагополучных пограничных/сосредельных стран								
		1	2	3	4	5	6	7	8	γ_i
1	Северо-Кавказский	8,2	6,3	4,7	4,8	3,4	3,5	6,5	4,1	0,519
2	Южный	7,3	5,7	4,3	3,4	3,2	2,5	3,0	3,3	0,409
3	Сибирский	7,2	5,8	3,9	5,5	3,6	3,5	4,9	3,3	0,471
4	Дальневосточный	8,2	7,5	5,3	5,3	4,8	3,9	4,8	4,0	0,547
5	Центральный	3,5	3,0	2,7	0,5	3,7	0,5	0,5	1,6	0,020
6	Уральский	5,3	4,8	3,4	3,0	2,5	1,4	2,1	2,4	0,311
7	Приволжский	5,7	4,6	4,4	2,5	2,8	1,7	2,2	2,8	0,334
8	Северо-Западный	1,5	2,5	2,0	0,4	2,1	0,4	0,3	1,8	0,137

из годовой вероятности реализации 0,1 (1/10), событие может произойти в течение последующего периода (2014–2023 гг.) не менее одного раза.

Для Приволжского и Уральского федеральных округов по вышеприведенной классификации событий вероятность заноса инфекции характеризуется как «умеренная», с учетом того факта, что на протяжении длительного периода (более 30 лет) их территория была благополучной по ящуру. В 2017 г. ящур впервые был зарегистрирован в Башкортостане (При-

волжский федеральный округ). Следовательно, существует определенная вероятность реализации события (заноса ящура) в последующий 10-летний период наблюдения.

Таким образом, проведенный анализ результатов экспертного опроса показывает, что, исходя из эндемического неблагополучия некоторых пограничных и соседних государств по ящуру, сохраняется угроза заноса инфекции на территорию Российской Федерации по трем направлениям (рис. 2).

Рис. 2. Возможные пути заноса ящура на территорию РФ





Рис. 3. Субъекты РФ, проводившие профилактическую вакцинацию и мониторинг против ящура (А, О, Азия-1) в 2017 г.

Дальневосточный путь – определяет возможность заноса ящура типов О и А, которые могут проникнуть из неблагополучных стран Юго-Восточной Азии.

Северокавказский путь заноса определяет вероятность заноса ящура типов А, О, Азия-1, которые могут проникнуть из Турции и Ирана.

Центральноазиатский путь заноса определяет вероятность заноса ящура типов О и А, которые могут проникнуть из неблагополучных по ящуру сопредельных южных стран, а также из Китая и Монголии.

Одним из методов предотвращения возможного возникновения ящура в результате заноса инфекции из неблагополучных государств является проведение профилактической вакцинации восприимчивого поголовья животных в субъектах федеральных округов Российской Федерации, которые имеют широкие экономические связи с этими странами или непосредственно прилегают к их границам. Общая территория таких субъектов, на которых в 2017 г. были осуществлены мероприятия по вакцинации животных, показана на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3, вдоль всей границы РФ на глубину одного или нескольких районов проводилась иммунизация восприимчивого поголовья крупного и мелкого рогатого скота против ящура типов А, О и Азия-1.

При оценке риска заноса ящура на территорию Российской Федерации и анализе эффективности проведения профилактической вакцинации в зонах его наиболее вероятного возникновения актуальной задачей является оценка необходимого популяционно-го уровня защитного иммунного фона, чтобы в случае

попадания инфекции в стадо заболевание животных ящуром не могло получить распространения.

Для оценки необходимого уровня вакцинации восприимчивого поголовья животных (P), гарантирующего предохранение от распространения ящура, использовали общепринятую формулу, имеющую вид [8]:

$$P = 1 - (1/R_0),$$

где R_0 – значение базовой скорости репродукции [2] (среднее количество вторичных случаев инфекции, которые может вызвать один первично инфицированный индивидум/животное в полностью восприимчивой популяции в течение инфекционного периода).

Значение величины R_0 было определено на основании анализа имеющихся литературных данных по распространению ящура в популяции животных при различных способах их инфицирования. Так, в работе С. Bravo de Rueda и соавт. [6] наибольшее значение R_0 при заражении крупного рогатого скота от инфицированных овец составило порядка 6. При оценке данной величины при распространении ящура в популяции телят при контакте с инфицированными животными или контаминированными вирусом объектами внешней среды R_0 было оценено в пределах 4,6 [9]. По двум выборкам данная величина для крупного рогатого скота составит порядка 5,3. Для популяции восприимчивого поголовья невакцинированных свиней наименьшее значение величины R_0 оказалось равным 20 [5].

При значении величины $R_0 = 5,3$ имеем $P = 1 - (1/5,3) = 0,81$, т. е. для того, чтобы при заносе инфекции болезнь не могла возникнуть в стаде крупного

рогатого скота, необходимо провести профилактическую вакцинацию не менее 81% ее популяции с формированием у всех животных защитного иммунного фона.

Для поголовья свиней показатель данной величины составит: $P = 1 - (1/20) = 0,95$, т. е. для защиты свиней от ящура необходимо провести вакцинацию не менее 95% поголовья животных для угрожаемой фермы, хозяйства, комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты экспертной оценки заноса ящура на территорию Российской Федерации из неблагополучных пограничных/сопредельных государств показывают высокую вероятность реализации данного события на территории ряда федеральных округов, в первую очередь Дальневосточного и Северо-Кавказского.

Для предотвращения возникновения вспышки заболевания и распространения инфекции необходимо проводить профилактическую вакцинацию восприимчивого поголовья крупного рогатого скота с формированием защитного иммунного фона не менее чем у 81% популяции. Для популяции свиней (ферма, хозяйство, комплекс) данный показатель будет выше и составит порядка 95%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимов В. А., Лесных В. В., Радаев Н. Н. Риски в природе, технике, обществе и экономике. – М.: Деловой экспресс. – 2004. – 352 с.
2. Андерсон Р., Мэй Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль / пер. с англ. – М.: Мир, Научный мир, 2004. – 784 с.
3. Гуленкин В. М., Коренной Ф. И., Караулов А. К. Методические рекомендации количественной (балльной) оценки мнений экспертной группы по вопросам эпизоотологии инфекционных заболеваний животных, безопасности пищевой животноводческой и рыбной продукции. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2017. – 18 с.
4. План поэтапной борьбы с ящуром (ППБЯ) / FAO/МЭБ. – 2012. – URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/docs/PCP/RUS-PCP-updated.pdf.
5. A meta-analysis quantifying transmission parameters of FMDV strain O Taiwan among non-vaccinated and vaccinated pigs / P. L. Eblé, A. A. de Koeijer, M. C. M. de Jong [et al.] // *Prev. Vet. Med.* – 2008. – Vol. 83, No. 1. – P. 98–106.
6. Estimation of the transmission of foot-and-mouth disease virus from infected sheep to cattle / C. Bravo de Rueda, M. C. M. de Jong, P. L. Eblé,

A. Dekker // *Vet. Res.* – 2014. – Vol. 45:58. – URL: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-45-58>.

7. Guidelines for Import Risk Analysis. Draft September 2001 / Agriculture, Fisheries and Forestry (AFFA). – Canberra, Australia, 2001. – 119 p.

8. Plotkin S. A., Orenstein W. A., Offit P. A. Vaccines. – 5th ed. – Amsterdam: Elsevier, 2008. – 1725 p.

9. Quantification of transmission of foot-and-mouth disease virus caused by an environment contaminated with secretions and excretions from infected calves / C. Bravo de Rueda, M. C. M. de Jong, P. L. Eblé, A. Dekker // *Vet. Res.* – 2015. – Vol. 46:43. – URL: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-015-0156-5>.

10. World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. – URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.

REFERENCES

1. Akimov V. A., Lesnykh V. V., Radayev N. N. Risks observed in nature, technosphere, society and economy [Riski v prirode, tekhnosfere, obshchestve i ekonomike]. M.: Delovoy express; 2004 (in Russian).
2. Anderson R., May R. Infectious diseases of humans. Dynamics and control / translation from English [Infektsionnye bolezni cheloveka. Dinamika i kontrol']. M.: Mir, Nauchnyj mir; 2004 (in Russian).
3. Gulenkin V. M., Korennoy F. I., Karaulov A. K. Methodical recommendations for quantitative (score) assessment of the expert group opinions on animal infectious diseases epidemiology, animal and fish product safety [Metodicheskie rekomendatsii kolichestvennoj (ball'noj) ocenki mnenij ekspertnoj grupy po voprosam epizootologii infektsionnyh zabolevanij zhivotnykh, bezopasnosti pishchevoj zhivotnovodcheskoj i rybnoj produkcii]. Vladimir: FGBU "ARRIAH"; 2017 (in Russian).
4. Progressive control pathway for FMD control (PCP-FMD). FAO/OIE; 2012. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/docs/PCP/RUS-PCP-updated.pdf.
5. Eble P. L., de Koeijer A. A., de Jong M. C. M. et al. A meta-analysis quantifying transmission parameters of FMDV strain O Taiwan among non-vaccinated and vaccinated pigs. *Prev. Vet. Med.* 2008; 83 (1): 98–106.
6. Bravo de Rueda C., de Jong M. C. M., Eble P. L., Dekker A. Estimation of the transmission of foot-and-mouth disease virus from infected sheep to cattle. *Vet. Res.* 2014; 45:58. URL: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-45-58>.
7. Guidelines for Import Risk Analysis. Draft September 2001. Agriculture, Fisheries and Forestry (AFFA). Canberra, Australia; 2001.
8. Plotkin S. A., Orenstein W. A., Offit P. A. Vaccines. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2008.
9. Bravo de Rueda C., de Jong M. C. M., Eble P. L., Dekker A. Quantification of transmission of foot-and-mouth disease virus caused by an environment contaminated with secretions and excretions from infected calves. *Vet. Res.* 2015; 46:43. URL: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-015-0156-5>.
10. World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.

Поступила 26.03.18

Принята в печать 17.05.18



АНТИГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АССОЦИИРОВАННОЙ ВИРУСВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ ОВЕЦ И ОСПЫ КОЗ

А. В. Константинов¹, С. К. Старов², В. И. Диев³, Н. В. Мороз⁴, Е. В. Курненко⁵,
Д. К. Басова⁶, А. В. Кононов⁷, К. Ю. Федосеев⁸

¹ Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: konstantinov@arriah.ru

² Заместитель директора, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: starov@arriah.ru

³ Доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: diev@arriah.ru

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

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

⁶ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: basova@arriah.ru

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

⁸ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: fedoseev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Проведены исследования по изучению антигенной и протективной активности экспериментальной ассоциированной вакцины, содержащей в полевой вакцинной дозе антигены из аттенуированных штаммов «ВНИИЗЖ» вируса оспы овец и «ВНИИЗЖ 2003» вируса оспы коз в соотношении 4,24 и 4,24 Ig ТЦД₅₀/см³, 4,18 и 4,37 Ig ТЦД₅₀/см³ и 4,37 и 4,18 Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно, а также моновалентных вакцин с инфекционной активностью указанных штаммов с титром 4,5 Ig ТЦД₅₀/см³. Введение ассоциированной вирусвакцины не оказывало отрицательного влияния на физиологическое состояние животных и сопровождалось образованием вируснейтрализующих антител в защитных титрах, не отличающихся от титров антител в крови овец и коз при моновалентной иммунизации. Установлено образование в сыворотках крови всех овец и коз, привитых ассоциированными вакцинами, высокого уровня вируснейтрализующих антител в пределах (3,50 ± 0,50)–(4,05 ± 0,22) и (3,58 ± 0,08)–(4,00 ± 0,29) log, соответственно. Антигенная активность ассоциированных вакцин для коз и овец практически идентична. Не выявлено отрицательного влияния на антигенную активность различных соотношений аттенуированных штаммов вируса оспы овец и оспы коз в прививной дозе. Все овцы, привитые моновалентной против оспы овец и ассоциированными вирусвакцинами, противостояли заболеванию при контрольном заражении вирулентным вирусом оспы овец штамма «Афганский». У трех овец, привитых моновалентной вакциной против оспы коз, выявлено наличие обширной местной реакции, у одной – заболевание оспой в генерализованной форме.

Ключевые слова: ассоциированная вирусвакцина, антитела, штаммы, вирус оспы овец, оспа коз, полевая вакцинная доза.

ВВЕДЕНИЕ

Оспа овец и оспа коз относятся к группе особо опасных инфекций животных. Возбудителями болезней являются близкородственные, но таксономически самостоятельные виды вируса оспы овец и оспы коз, относящиеся к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae* и вызывающие тяжелую форму болезни только у одного вида. Согласно международной классификации МЭБ оспа овец и коз включена в категорию «Болезни овец и коз» [9], а согласно приказу Минсельхоза РФ от 19 декабря 2011 г. № 476 оспа овец и коз входит в «Перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)».

Заболевание характеризуется поражением кожи и слизистых оболочек, образованием розеол, перехо-

дящих в папулы и везикулы, а затем в пустулы на бесшерстных участках тела, серозно-слизистыми или гнойными истечениями из глаз и носа, повышением температуры тела. К оспе овец восприимчивы сайгаки, козероги, газели. Летальность, в зависимости от породы, возраста животных и формы течения болезни, может достигать 50–100% [2, 5].

Оспа овец и коз имеет широкое распространение. В 2016–2017 гг. неблагополучие по этому заболеванию зарегистрировано в 34 странах Африканского, Азиатского и Европейского регионов. Наибольшую опасность для территории Российской Федерации представляют Китай, Монголия, Турция, являющиеся пограничными странами, где за указанный период было выявлено 88, 122 и 132 очага инфекции соответственно.

ANTIGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF EXPERIMENTAL ASSOCIATED VIRUS VACCINE AGAINST SHEEP POX AND GOAT POX

A. V. Konstantinov¹, S. K. Starov², V. I. Diev³, N. V. Moroz⁴, E. V. Kurnenkova⁵, D. K. Basova⁶, A. V. Kononov⁷, K. Yu. Fedoseyev⁸

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

² Deputy Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: starov@arriah.ru

³ Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: diev@arriah.ru

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

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

⁶ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: basova@arriah.ru

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

⁸ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: fedoseev@arriah.ru

SUMMARY

Studies have been carried on antigenic and protective activity of the experimental associated vaccine containing, in the field vaccination dose, antigens of the attenuated ARRIAH strain of the sheep pox virus and ARRIAH 2003 strain of the goat pox virus in the ratio of 4.24 and 4.24 lg TCD₅₀/cm³, 4.18 and 4.37 lg TCD₅₀/cm³ and 4.37 and 4.18 lg TCD₅₀/cm³ respectively, as well as monovalent vaccines with the infectious activity of these strains with a titer of 4.5 lg TCD₅₀/cm³. Administration of the associated virus vaccine did not adversely affect the physiological state of the animals and was accompanied by the formation of viral neutralizing antibodies in protective titres that did not differ from antibody titers in the blood of sheep and goats during monovalent immunization. High levels of virus neutralizing antibodies in the range of (3.50 ± 0.50)–(4.05 ± 0.22) and (3.58 ± 0.08)–(4.00 ± 0.29) log₂ respectively were determined in the blood serum of all sheep and goats vaccinated with associated vaccines. The antigenic activity of the associated vaccines for goats and sheep is almost identical. There were no negative effects on the antigenic activity of different ratios of attenuated strains of the sheep pox and goat pox virus in the inoculation dose. All sheep immunized with the monovalent vaccine against sheep and goat pox and associated virus vaccines, resisted the disease when challenged with a virulent sheep pox virus "Afghanistan" strain. Three sheep vaccinated with a monovalent vaccine against goat pox demonstrated a large local reaction, one sheep was diagnosed with generalized form of sheep pox.

Key words: associated virus vaccine, antibodies, strains, sheep pox virus, goat pox, field vaccination dose.

Территория Российской Федерации в 2010–2017 гг. (за исключением 2014 и 2017 гг.) была неблагополучна по оспе овец и коз [4]. Анализ эпизоотической ситуации в мире по этому заболеванию свидетельствует об обострении ситуации с возможностью заноса инфекции на территорию Российской Федерации, в частности в Сибирский федеральный округ, Забайкальский, Хабаровский и Приморский края, Амурскую область, Чеченскую Республику, Республику Дагестан и др. [3, 4].

Учитывая высокую степень опасности возникновения оспы овец и оспы коз в РФ, необходимо проводить профилактическую вакцинацию в указанных регионах с использованием высокоэффективных вакцин. В различных странах мира широко применяются моновалентные вакцины, которые обеспечивают надежную защиту животных от заболевания оспой овец и оспой коз [2, 7].

Для иммунизации коз часто применяют моновалентную вакцину против оспы овец, которая не предохраняет животных от заболевания. Аналогичные результаты получены при иммунизации овец моновалентной вирусвакциной против оспы коз [8]. При угрозе возникновения оспы овец и оспы коз более перспективным является применение ассоциированной вирусвакцины,

которая способна в короткие сроки с наименьшими затратами предохранить животных от заболевания. Об успешных разработках в этом направлении имеются сообщения И. Л. Бакулова [1], Ф. П. Курченко и соавт. [5], М. Hosomani и соавт. [6].

Об иммунологической полноценности ассоциированной вакцины судят по уровню антител к антигенам, входящим в состав препарата, в сравнении со специфической активностью сывороток крови животных, привитых моновалентными вакцинами, а также после заражения вирулентными штаммами вируса оспы.

Оптимальное соотношение антигенов в ассоциированной вакцине гарантирует ее высокую эффективность при профилактической иммунизации животных против инфекционных заболеваний.

Целью исследований было определить антигенную и протективную активность ассоциированной вирусвакцины из аттенуированных штаммов вирусов оспы овец и оспы коз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изготовления экспериментальной ассоциированной вирусвакцины были использованы аттенуированные штаммы «ВНИИЗЖ» вируса оспы овец (ОО)

Таблица 1
Результаты изучения на овцах антигенной и протективной активности
ассоциированной вирусвакцины против оспы овец и оспы коз

№ группы жив-х	Вирусвакцина	Соотношение вируса ОО и ОК в полевой прививной дозе (lg ТЦД ₅₀ /см ³)	Титр антител (log ₂) после вакцинации, сут			Протективная активность	
			к вирусу	14	21	наличие местной реакции	генерализация
1	ОО и ОК	4,24 + 4,24 (1:1)	ОО	3,00 ± 0,21	3,63 ± 0,13	1/3*	–
			ОК	3,27 ± 0,21	3,50 ± 0,50	–	–
2	ОО и ОК	4,18 + 4,37 (1:3)	ОО	3,17 ± 0,31	4,00 ± 0,50	–	–
			ОК	3,33 ± 0,31	3,51 ± 0,98	–	–
3	ОО и ОК	4,37 + 4,18 (3:1)	ОО	3,33 ± 0,12	4,05 ± 0,22	–	–
			ОК	3,25 ± 0,20	3,87 ± 0,12	–	–
4	ОО	4,5	ОО	3,62 ± 0,12	4,08 ± 0,31	–	–
			ОК	2,50 ± 0,50	2,25 ± 0,25	–	–
5	ОК	4,5	ОО	2,75 ± 0,25	3,75 ± 0,25	–	–
			ОК	3,12 ± 0,37	4,17 ± 0,23	3/3	1/3
6	контроль	–				2/2	2/2

* В числителе – количество овец с положительной реакцией; в знаменателе – количество животных в опыте.

и «ВНИИЗЖ 2003» вируса оспы коз (ОК), расплодку которых получали на перевиваемой монослойной культуре клеток гонады домашней козы (ЯДК-04). Полученную расплодку проверяли на стерильность, инфекционную активность на культуре клеток ЯДК-04 методом десятикратных разведений, которую выражали в lg ТЦД₅₀/см³. В работе использовали расплодку указанных штаммов с одинаковым титром 7,0 lg ТЦД₅₀/см³. Штаммы возбудителей ОО и ОК объединяли в соотношениях: 1:1 с содержанием вирусов в препарате 4,24 и 4,24 lg ТЦД₅₀/см³, 1:3 с содержанием вирусов в ПВД 4,18 и 4,37 lg ТЦД₅₀/см³ и 3:1 с содержанием в ПВД 4,37

и 4,18 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Проводили сравнение специфической активности ассоциированных вакцин с моновалентными вакцинами против ОО и ОК с содержанием штаммов в препарате по 4,5 lg ТЦД₅₀/см³. В каждый из указанных препаратов добавляли стабилизатор, фасовали во флаконы по 4,0 см³, подвергали лиофильному высушиванию, заполняли сухим стерильным воздухом, закрывали резиновыми пробками и закатывали металлическими колпачками. Изготовленные экспериментальные ассоциированные и моновалентные вирусвакцины хранили при (4,0 ± 0,5) °С до проведения исследований.

Таблица 2
Антигенная активность на козах ассоциированной вирусвакцины против оспы овец и оспы коз

№ группы жив-х	Вирусвакцина	Соотношение вируса ОО и ОК в полевой прививной дозе (lg ТЦД ₅₀ /см ³)	Против вируса	Титр антител (log ₂) после вакцинации, сут	
				14	21
1	ОО и ОК	4,24 + 4,24 (1:1)	ОО	3,50 ± 0,14	3,67 ± 0,08
			ОК	3,50 ± 0,29	4,00 ± 0,29
2	ОО и ОК	4,18 + 4,37 (1:3)	ОО	3,33 ± 0,22	3,58 ± 0,08
			ОК	3,72 ± 0,15	3,75 ± 0,14
3	ОО и ОК	4,37 + 4,18 (3:1)	ОО	3,42 ± 0,22	3,67 ± 0,08
			ОК	3,67 ± 0,36	3,92 ± 0,22
4	ОО	4,5	ОО	3,67 ± 0,08	4,00 ± 0,25
			ОК	3,42 ± 0,22	3,42 ± 0,22
5	ОК	4,5	ОО	3,17 ± 0,08	3,58 ± 0,08
			ОК	4,17 ± 0,15	4,42 ± 0,22

Таблица 3

Вируснейтрализующая активность сыворотки крови овец и коз хозяйств личного пользования после иммунизации ассоциированной вакциной

№ группы жив-х	Вид животных	Титр антител к вирусу оспы ($\log_2$) после вакцинации, сут			
		овец		коз	
		21	90	21	90
1	Овцы	$2,853 \pm 0,077$	$3,017 \pm 0,102$	$3,662 \pm 0,057$	$3,150 \pm 0,111$
2	Козы	$3,050 \pm 0,122$	$3,068 \pm 0,107$	$3,417 \pm 0,072$	$3,386 \pm 0,098$

Изучение антигенной и протективной активности вирусвакцины проводили на 32 животных 2–3-летнего возраста: 17 овцах романовской породы и 15 козах местной породы, отобранных по принципу аналогов, не содержащих в крови антител против оспы. Каждым образцом вирусвакцины прививали по 6 животных, разделенных на 2 группы: по 3 овцы и 3 козы в каждой группе. Вакцины разводили ФБР (рН 7,4) согласно количеству 100 прививных доз во флаконе и вводили подкожно в область внутренней стороны бедра по $1,0 \text{ см}^3$.

Антигенную активность вирусвакцины определяли исследованием сывороток крови, полученных через 14 и 21 сут после вакцинации в реакции микронеutralизации в культуре клеток ЯДК-04 против $100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ гомо- и гетерологичного вирусов ОО и ОК. Титр антител выражали в $\log_2$.

Через 21 сут после вакцинации всех овец заразили суспензией вирулентного вируса ОО штамма «Афганский» введением 500 ИД_{50} по $0,5 \text{ см}^3$ подкожно в область подхвостовой складки. Контролем служили 2 неиммунные овцы. Учет результатов заражения проводили в течение 13 сут (срок наблюдения) по наличию на кожных покровах специфических оспенных образований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение ассоциированной вирусвакцины не оказывало отрицательного влияния на физиологическое состояние животных и сопровождалось образованием вируснейтрализующих антител в защитных титрах, не отличающихся от титров антител в крови овец и коз при моновалентной иммунизации. Не установлено существенных различий специфической активности сывороток крови овец и коз, привитых ассоциированными вирусвакцинами, содержащими в прививной дозе антигены вируса ОО и ОК, что, по-видимому, связано с наличием в ПВД высокого титра аттенуированного вируса оспы не ниже $4,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Так, титр антител в крови овец через 14 и 21 сут после введения ассоциированной вирусвакцины, с соотношением антигенов в ПВД вируса ОО и ОК 1:1, к вирусу ОО был $(3,00 \pm 0,21)$ и $(3,63 \pm 0,13) \log_2$, а к вирусу ОК – $(3,27 \pm 0,21)$ и $(3,50 \pm 0,50) \log_2$ (табл. 1).

Специфическая активность сывороток крови овец, привитых ассоциированной вирусвакциной с содержанием антигенов вируса ОО и ОК в ПВД 1:3, характеризовалась наличием защитного титра антител к вирусу ОО в эти же сроки $(3,17 \pm 0,31)$ и $(4,00 \pm 0,50) \log_2$, а к вирусу ОК – $(3,33 \pm 0,31)$ и $(3,51 \pm 0,98) \log_2$. Аналогичные результаты получены при введении животным вирусвакцины с содержанием антигенов вируса ОО и ОК 3:1. Титры

антител в крови в указанные сроки были в пределах $(3,33 \pm 0,12)$ и $(4,05 \pm 0,22) \log_2$, а также $(3,25 \pm 0,20)$ и $(3,87 \pm 0,12) \log_2$ соответственно.

При этом выявлены различия активности сывороток крови овец, привитых гомо- и гетерологичными моновалентными вирусвакцинами ОО и ОК. Так, на 14-е сут после иммунизации овец вирусвакциной с содержанием в прививной дозе гомологичного антигена ОО $4,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ титр антител был $(3,62 \pm 0,12) \log_2$, а к гетерологичному вирусу ОК – $(2,50 \pm 0,50) \log_2$.

Иммунизация овец вирусвакциной против ОК сопровождалась образованием антител, уровень которых был незначительно выше к гомологичному вирусу ОК $(3,12 \pm 0,37)$ и $(4,17 \pm 0,23) \log_2$, а к гетерологичному вирусу ОО – $(2,75 \pm 0,25)$ и $(3,75 \pm 0,25) \log_2$. Незначительные отличия в специфической активности сывороток крови, возможно, связаны с более широким антигенным спектром вируса ОК в сравнении с ОО.

Установлено, что все овцы, иммунизированные ассоциированными вакцинами, а также привитые моновалентной вакциной против ОО, через 21 сут были устойчивы к заболеванию оспой при заражении вирулентным вирусом ОО штамма «Афганский», тогда как у всех трех овец, привитых моновалентной вакциной против ОК, выявлено наличие обширной местной реакции в виде отека и гиперемии $3 \times 5 \text{ см}$ на месте введения суспензии вируса и у одной – заболевание оспой в генерализованной форме. Две контрольные овцы заболели оспой в генерализованной форме с образованием папул и пустул на морде в области губ и носа, а также на бесшерстных участках передних и задних конечностей.

При изучении антигенной активности ассоциированных вакцин на козах получены результаты, практически идентичные результатам на овцах (табл. 2). Не выявлено отрицательного влияния на антигенную активность различных соотношений аттенуированных штаммов вируса ОО и ОК в прививной дозе.

Так, при одинаковом соотношении (1:1) аттенуированных вирусов ОО и ОК в ПВД титры антител у коз к вирусам ОО и ОК на 14-е сут после введения вакцины были $(3,50 \pm 0,14)$ и $(3,50 \pm 0,29) \log_2$, а на 21-е сут – $(3,67 \pm 0,08)$ и $(4,00 \pm 0,29) \log_2$ соответственно (табл. 2).

Соотношение вакцинных штаммов в ПВД 1:3 после вакцинации коз сопровождалось образованием вируснейтрализующих антител к возбудителям ОО и ОК в указанные сроки в титрах $(3,33 \pm 0,22)$ и $(3,72 \pm 0,15) \log_2$, а также $(3,58 \pm 0,08)$ и $(3,75 \pm 0,14) \log_2$.

Аналогичные результаты получены после инокуляции ассоциированной вакцины, содержащей в ПВД вирусов ОО и ОК в соотношении 3:1. Титры антител в эти

же сроки были $(3,42 \pm 0,22)$ и $(3,67 \pm 0,36) \log_2$, а также $(3,67 \pm 0,08)$ и $(3,92 \pm 0,22) \log_2$.

Иммунизация коз моновалентными вакцинами с содержанием в ПВД ОО и ОК по $4,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ аттенуированных штаммов сопровождалась на 14-е и 21-е сут образованием в крови против гомо- и гетерологичных вирусов антител в высоких титрах: $(3,67 \pm 0,08)$ – $(3,17 \pm 0,08)$ и $(4,00 \pm 0,25)$ – $(3,58 \pm 0,08)$, $(3,42 \pm 0,22)$ – $(4,17 \pm 0,15)$, а также $(3,42 \pm 0,22)$ и $(4,42 \pm 0,22) \log_2$ соответственно.

В дальнейшем были проведены исследования эффективности ассоциированной вирусвакцины против ОО и ОК производственной серии в практических условиях. С этой целью вакцину, согласно инструкции, вводили овцам и козам, находящимся в хозяйствах личного пользования, и изучали антигенную активность препарата по титрам вируснейтрализующих антител в крови после иммунизации животных методом постановки реакции микронейтрализации. Всего исследовано 120 проб сывороток крови овец и коз, полученных в количестве 30 шт. на 21-е и 90-е сут после вакцинации животных (табл. 3). Установлено образование антител к вирусам ОО и ОК после иммунизации животных обоих видов, уровень которых в крови овец был высоким и соответствовал $(2,853 \pm 0,077)$ и $(3,017 \pm 0,102) \log_2$ к вирусу ОО, $(3,662 \pm 0,057)$ и $(3,150 \pm 0,111) \log_2$ – к ОК, а в крови коз – $(3,050 \pm 0,122)$ и $(3,068 \pm 0,107) \log_2$ к вирусу ОО, а к возбудителю ОК – $(3,417 \pm 0,072)$ и $(3,386 \pm 0,098) \log_2$ на 21-е и 90-е сут соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные ассоциированные вирусвакцины с содержанием в ПВД $(4,24 + 4,24)$, $(4,18 + 4,37)$ и $(4,37 + 4,18) \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ аттенуированных штаммов вирусов ОО и ОК обладали выраженными антигенными и протективными свойствами. Отрицательного воздействия на формирование иммунитета у овец и коз после введения препаратов не отмечено. Это, по-видимому, связано с наличием в ПВД не менее $4,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ каждого антигена, что значительно превышает ПВД, рекомендованную «Руководством по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (МЭБ)» [9], которая соответствует $2,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Ассоциированная вирусвакцина против оспы овец и оспы коз производственной серии обладала выраженными антигенными свойствами при использовании в практических условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические свойства экспериментальной ассоциированной вакцины против сибирской язвы и оспы овец / И. А. Бакулов, В. М. Балышев, Ю. О. Селянинов [и др.] // Ветеринария. – 2001. – № 1. – С. 39–41.
2. Изучение эффективности вирусвакцины против оспы на овцах в экспериментальных условиях и условиях эпизоотии / В. И. Диев, С. К. Старов, Д. К. Басова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 2. – С. 62–66.

3. Париллов С. В., Книзе А. В., Балышев В. М. Анализ и прогноз мировой эпизоотической ситуации по оспе овец и коз и чумы мелких жвачных животных в 2011–2015 гг. // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – № 69(05). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2011/05/pdf/21.pdf>.

4. Прогноз по оспе овец и коз в Российской Федерации на 2018 год / А. В. Пискунов, А. В. Кононов, А. В. Спрыгин [и др.] // Прогнозы по заразным болезням животных в Российской Федерации на 2018 год / ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2018. – С. 186–195.

5. Стандартизация метода контроля иммуногенности вирусвакцины против оспы овец и коз / Ф. П. Курченко, В. И. Уласов, В. И. Диев [и др.] // Ветеринария. – 2006. – № 10. – С. 22–24.

6. A bivalent vaccine against goat pox and peste des petits ruminants induces protective immune response in goats / M. Hosomani, S. Kumar Singh, B. Mondal [et al.] // Vaccine. – 2006. – Vol. 24, No. 35–36. – P. 6058–6064.

7. A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep / W. Chen, S. Hu, L. Qu [et al.] // Vaccine. – 2010. – Vol. 28, No. 30. – P. 4742–4750.

8. Estimation of post-vaccination antibody titre against goat pox and determination of protective antibody titre / D. Barman, A. Chatterjee, C. Guha [et al.] // Small Ruminant Res. – 2010. – Vol. 93. – P. 76–78.

9. Sheep pox and goat pox // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). – 2017. – Vol. 2, Chap. 2.7.13. – 12 p. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_S_POX_G_POX.pdf.

REFERENCES

1. Bakulov I. A., Balyshev V. M., Selyaninov Yu. O. et al. Biological properties of experimental associated vaccine against anthrax and sheep pox [Biologicheskie svoystva eksperimental'noj associirovannoy vaktsiny protiv sibirskoy jazvy i ospy ovec]. *Veterinariya*. 2001; 1: 39–41 (in Russian).
2. Diev V. I., Starov S. K., Basova D. K. et al. Experimental study of efficacy of poxvirus vaccine administered to sheep under epidemic conditions [Izuchenie effektivnosti virusvaktsiny protiv ospy na ovцах v eksperimental'nykh usloviyakh i usloviyakh epizootii]. *Veterinary Science Today*. 2017; 2: 62–66 (in Russian).
3. Parilov S. V., Knize A. V., Balyshev V. M. Analysis and predictions of global epidemic situation for sheep and goat pox and PPR in 2011–2015 [Analiz i prognoz mirovoj epizooticheskoy situatsii po ospe ovec i koz i chumy melkih zhvachnykh zhivotnykh v 2011–2015 gg.]. *Nauchnyy zhurnal KubGAU*. 2011; 69. URL: <http://ej.kubagro.ru/2011/05/pdf/21.pdf> (in Russian).
4. Piskunov A. V., Kononov A. V., Sprygin A. V. et al. Predictions for sheep and goat pox in the Russian Federation in 2018 [Prognozy po zaraznym boleznyam zhivotnykh v Rossijskoj Federatsii na 2018 god]. FGBI "ARRIAH". Vladimir, 2018: 186–195 (in Russian).
5. Kurchenko F. P., Ulasov V. I., Diev V. I. et al. Standardization of immunogenicity control method for sheep and goat poxvirus vaccine [Standartizatsiya metoda kontrolya immunogennosti virusvaktsiny protiv ospy ovec i koz]. *Veterinariya*. 2006; 10: 22–24 (in Russian).
6. Hosomani M., Kumar Singh S., Mondal B. et al. A bivalent vaccine against goat pox and peste des petits ruminants induces protective immune response in goats. *Vaccine*. 2006; 24 (35–36): 6058–6064.
7. Chen W., Hu S., Qu L. et al. A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *Vaccine*. 2010; 28 (30): 4742–4750.
8. Barman D., Chatterjee A., Guha C. et al. Estimation of post-vaccination antibody titre against goat pox and determination of protective antibody titre. *Small Ruminant Res*. 2010; 93: 76–78.
9. Sheep pox and goat pox // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 2017; 2, (2.7.13). URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.13_S_POX_G_POX.pdf.

Поступила 21.04.18

Принята в печать 17.05.18

ИЗМЕНЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СЕЗОНА ЗАГОТОВКИ СЫРЬЯ

М. Н. Гусева¹, М. А. Шевченко², Д. С. Большаков³, М. И. Доронин⁴, Д. В. Михалишин⁵, А. А. Шишкова⁶, В. В. Михалишин⁷

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

² Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

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

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

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

⁶ Главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shishkova@arriah.ru

⁷ Главный эксперт, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: mihalishin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Для приготовления гидролизата белков крови исходным сырьем является цельная кровь рогатого скота, сгустки крови и другие отходы сыровоточного производства. Изучено влияние сезона заготовки сырья на аминокислотный состав гидролизата белков крови. Работа проводилась на протяжении трех лет. Показано, что содержание аминокислот менялось по сезонам. Пик, как правило, приходился на летние месяцы, в это время количество аминокислот увеличивалось в 1,2–2,3 раза, а в осенне-зимний период понижалось в 1,2–1,4 раза (различия существенны, $p < 0,05$). Максимум роста глутаминовой и аспарагиновой кислот приходился на ноябрь. Зафиксировано, что их содержание было выше в 1,4 раза по сравнению с предыдущими месяцами ($p < 0,01$). Увеличение количества аланина, аспарагиновой кислоты, валина, лизина, метионина, пролина, тирозина, треонина и фенилаланина было отмечено в марте в 1,3–1,8 раза (различия существенны, $p < 0,05$). Количество гистидина, глицина, лейцина, серина и триптофана в начале весны оставалось на прежнем уровне, а количество аргинина, аспарагина, изолейцина в марте уменьшалось в 1,2–1,6 раза (различия существенны, $p < 0,01$). Установлено, что сезонная динамика аминокислотного состава гидролизата белков крови напрямую была связана с сезонной динамикой физиолого-биохимических показателей крови крупного рогатого скота. Было отмечено, что при существенном изменении абсолютных показателей аминокислот их относительное количество в основном оставалось постоянным.

Ключевые слова: гидролизат белков крови, аминокислоты, физиологические показатели.

UDC 636:612.124:612.015.348

CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION OF BLOOD PROTEIN HYDROLYSATE DEPENDING ON THE RAW MATERIAL PREPARATION MATERIAL

M. N. Guseva¹, M. A. Shevchenko², D. S. Bolshakov³, M. I. Doronin⁴, D. V. Mikhilishin⁵, A. A. Shishkova⁶, V. V. Mikhilishin⁷

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

² Leading veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of science (Chemistry) FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: bolshakov@arriah.ru

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

⁵ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: mihalishin_dv@arriah.ru

⁶ Chief technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: shishkova@arriah.ru

⁷ Chief Expert, Information and Analysis Centre, Doctor (Veterinary Medicine), Professor FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, 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 amino acid composition of blood protein hydrolysate on the season of the raw material preparation was studied. The research lasted three years. It was demonstrated that the amino acid composition changed depending on the season. The peak, as a rule, was during summer months when their amount increased by 1.2–2.3 times and during autumn and winter it went down by 1.2–1.4 times (the difference is considerable, $p < 0,05$). The peak of glutamic and asparagine acid growth was in November when their amount was 1.4 times higher then during the previous months ($p < 0,01$). The increase of alanine, asparagine, valine, lysine, methionine, histidine, proline, tyrosine, threonine, and phenylalanine by 1.3–1.8 times was observed in March (the difference is considerable, $p < 0,05$). The amount of histidine, glycine, leucine, serine, and tryptophane in the beginning of spring was at the same level and the amount of arginine, asparagine, isoleucine in March decreased by 1.2–1.6 times (the difference is considerable, $p < 0,01$). So, it was determined that the dynamics of BPH amino acid composition was directly associated with the seasonal dynamics of physiological and biochemical cattle blood values. It was noted that in case of considerable change in absolute amino acid parameters their relative amount, in general, remained constant.

Key words: blood protein hydrolysate, amino acids, physiological parameters.

ВВЕДЕНИЕ

В биотехнологии сформировано и интенсивно развивается направление, связанное с конструированием питательных сред, содержащих в качестве источников аминокислот ферментативные гидролизаты белков крови (ГБК) животных и растений [7, 9, 10].

Белковые гидролизаты представляют собой продукты расщепления белка до аминокислот и простых пептидов. Гидролизаты обычно содержат 16–20 аминокислот с вариабельной концентрацией, а также пептиды разной молекулярной массы [4, 11].

Известны три метода гидролиза белков – кислотный, щелочной и ферментативный. При всех этих видах гидролиза происходит расщепление белка на составные части, однако конечные продукты различны. В данных исследованиях использовали ГБК с ферментативным методом гидролиза [14].

В нашей стране широко используются гидролизаты белков крови животных, главным образом крупного рогатого скота (КРС). Кровь является лучшим сырьем, она содержит 18% полноценного белка, а также минеральные вещества, которые остаются в препарате при его изготовлении [3, 6]. Исходным сырьем для получения ГБК являются цельная кровь КРС, ее сгустки и другие отходы сыровоточного производства [14].

Важное значение имеет изучение морфологического и биохимического состава крови, дающее определенное представление о закономерностях изменения внутренней среды организма. Так, наблюдалась тенденция снижения величины морфологических показателей в зимний период, что, очевидно, обусловлено снижением интенсивности обменных процессов у животных всех пород [2].

Сезон года – комплексный фактор, который включает климатическую специфику зоны, особенности кормления, моцион и инсоляцию в летнее время, – вызывает у коров существенные изменения морфологической картины крови. Для зимнего периода характерны смещения показателей крови, которые в целом можно назвать неблагоприятными изменениями гомеостаза. Так, зимой у КРС, независимо от его физиологического состояния, в крови обнаружено на 1–2 тысячи больше лейкоцитов, в частности фагоцитирующих нейтрофилов. При этом отмечается более низкий уровень гемоглобина в цельной крови КРС. Под влиянием солнечной инсоляции, активного моциона и зеленых кормов улучшается общее состояние животных, нормализуется воспроизводительная функция и повышается молочная продуктивность. При переводе на пастбище коров черно-пестрой породы в условиях хозяйства Тульской области уже через 2 недели в крови повышалось количество эритроцитов, уровень гемоглобина и сокращалась доля фагоцитирующих лейкоцитов [8]. Таким образом, сезонный фактор существенно влияет на гомеостаз КРС, а следовательно, и на сырье для изготовления ГБК.

Целью работы было изучение аминокислотного состава ГБК в зависимости от сезона заготовки сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гидролизат белков крови жидкий, полученный из ООО НПП «Биохимсервис».

Аминокислотный состав ГБК определяли 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»».

Для статистической обработки данных вычисляли среднее арифметическое значение и его ошибку для каждой аминокислоты ежемесячно. Существенность различия между средними показателями двух выборок оценивали с помощью критерия Стьюдента (t), который представлял собой отношение разности между средними значениями к ошибке этой разности [1].

Уровень значимости отражал степень уверенности в истинности полученных данных и показывал, какова вероятность случайного возникновения исследуемых показателей. В представленных опытах его коэффициент составлял не более 0,05 (5%).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении аминокислотного состава гидролизата белков крови было установлено, что содержание аминокислот менялось по сезонам года (табл., рис. 1–6). Пик, как правило, приходился на летние месяцы.

При ежемесячном сравнении содержания аминокислот в ГБК было замечено, что количество заменимых аминокислот (аланина, аспарагиновой кислоты, пролина) и незаменимых аминокислот (валина, лизина, метионина, тирозина, треонина, фенилаланина) увеличивалось в марте в 1,3–1,8 раза (различия существенны, $p < 0,05$). Содержание таких заменимых аминокислот, как глицин, серин, и незаменимых аминокислот – гистидина, лейцина и триптофана – в начале весны оставалось на прежнем уровне. Концентрация аргинина, аспарагина, изолейцина в марте уменьшалась в 1,2–1,6 раза (различия существенны, $p < 0,01$).

Вероятно, такое различие в динамике количества аминокислот в начале весны было связано с изменением рациона питания и содержания КРС. Алиментарный стресс, связанный с однообразием кормления, а также с недостатком зеленых кормов в это время года, способствует глубокому нарушению процессов адаптации, приводящих к ухудшению здоровья животных и снижению продуктивности [5, 13].

Известно, что поздний зимне-стойловый период является наиболее стрессогенным, что связано с некомпенсированным возрастанием процессов свободнорадикального окисления на фоне истощения собственной системы антиоксидантной защиты. Развивающаяся в это время стресс-реакция организма достигает значительной интенсивности и длительности и превращается из звена адаптации в звено патогенеза. Поэтому с целью сохранения здоровья и продуктивности животных применяют противострессовые и антиоксидантные препараты, а также включают в рацион различные добавки [5].

Из данных, представленных в таблице и на рисунке 1, видно, что для заменимой аминокислоты аланин и незаменимой аминокислоты валин характерна стандартная картина изменения концентрации в зависимости от сезона года: количество аминокислот в летние месяцы увеличивалось в 1,3–1,4 раза, понижалось в осенне-зимний период в 1,2–1,5 раза (различия существенны, $p < 0,05$).

Пик концентрации глутаминовой (рис. 1) и аспарагиновой (рис. 4) кислот приходился на ноябрь, их количе-

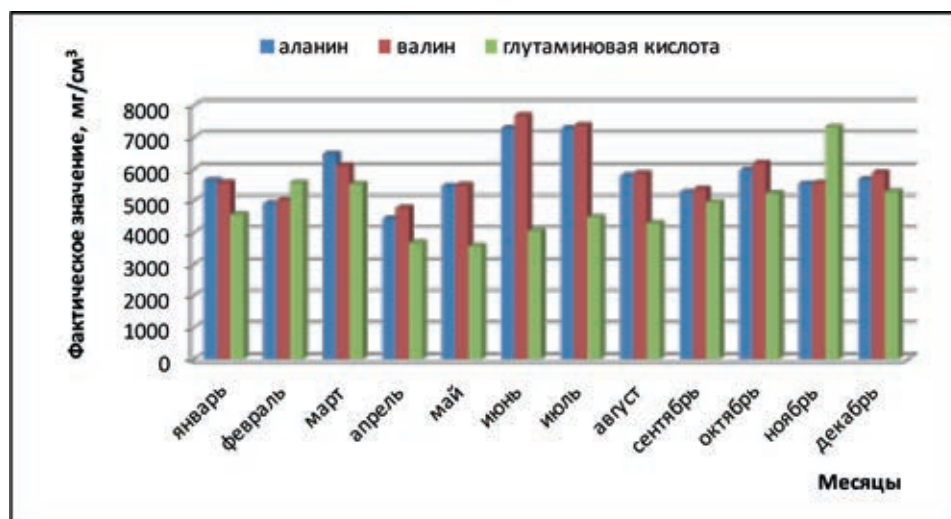


Рис. 1. Сезонная динамика аминокислотного состава ГБК (по аминокислотам аланин, валин, глутаминовая кислота)

ство по сравнению с содержанием в предыдущих месяцах было больше в 1,4 раза (различия существенны, $p < 0,01$). Данные соединения являются заменимыми аминокислотами.

Уникальность глутаминовой и аспарагиновой аминокислот в том, что для взаимного превращения друг в друга все заменимые аминокислоты должны превратиться вначале в глутаминовую или аспарагиновую кислоту. Этот факт определяет их интегрирующую роль в азотистом обмене. Однако данная особенность не исчерпывается лишь компенсацией недополученных с пищей аминокислот. Известен также феномен «перераспределения азота в организме». При дефиците белка в том или ином органе вследствие заболевания или гиперфункции (необходимость рабочей гипертрофии) происходит перераспределение азота: белок «изымается» из одних внутренних органов и направляется в другие [11, 12]. Таким образом, вероятно, при переводе животных на силосно-концентратный тип кормле-

ния происходит увеличение в организме содержания глутаминовой и аспарагиновой кислот.

Из данных, представленных в таблице и на рисунке 2, видно, что в ГБК отмечалась стандартная сезонная динамика изменения содержания незаменимых аминокислот лейцина, лизина и фенилаланина: количество аминокислот в летние месяцы увеличивалось в 1,3–1,6 раза, понижалось в осенне-зимний период в 1,2–1,5 раза (различия существенны, $p < 0,05$).

Выявлено, что содержание аргинина (рис. 3) увеличивалось к концу года в 1,4 раза ($p < 0,05$), понижалось в марте в 1,6 раза ($p < 0,01$) и оставалось довольно стабильным в летние месяцы. Количество глицина, пролина, серина (табл., рис. 4), а также изолейцина, метионина, триптофана и тирозина (табл., рис. 5) увеличивалось в летние месяцы в 1,3–2,3 раза, понижалось в осенне-зимний период в 1,2–1,4 раза (различия существенны, $p < 0,05$).

При оценке относительного содержания аминокислот в ГБК было выявлено, что на протяжении всех сезо-

Рис. 2. Сезонная динамика аминокислотного состава ГБК (по незаменимым аминокислотам лейцин, лизин, фенилаланин)

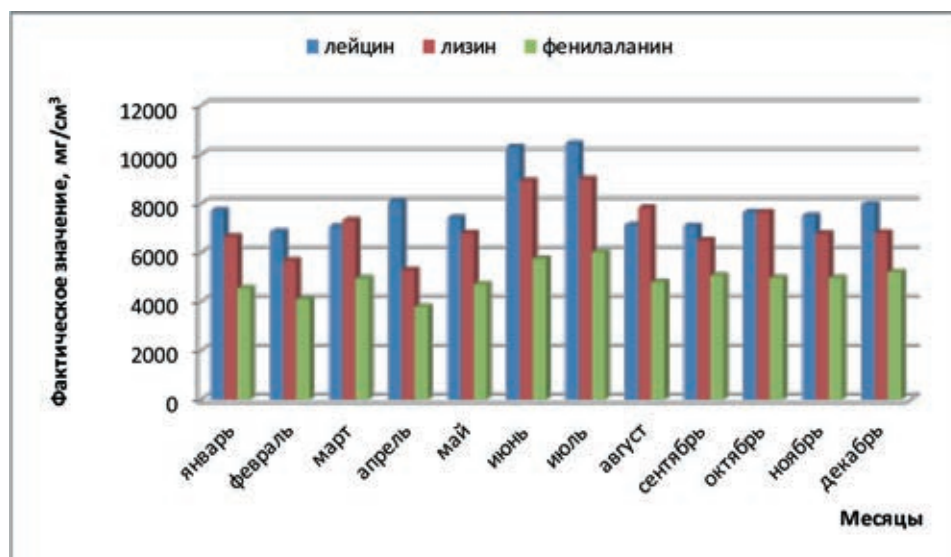


Таблица 1
Изменения аминокислотного состава ГБК по месяцам

Аминокислота	Фактическое значение, мг/см ³											
	Январь (n = 27)	Февраль (n = 15)	Март (n = 24)	Апрель (n = 13)	Май (n = 20)	Июнь (n = 12)	Июль (n = 13)	Август (n = 6)	Сентябрь (n = 16)	Октябрь (n = 28)	Ноябрь (n = 28)	Декабрь (n = 25)
Аланин	5638,9 ± 181,8	4908,0 ± 176,7	6463,3 ± 659,8	4426,9 ± 568,8	5457,0 ± 218,3	7274,3 ± 681,3	7272,7 ± 508,1	5785,0 ± 196,5	5265,9 ± 151,7	5956,3 ± 248,5	5531,1 ± 170,5	5664,4 ± 104,7
Аргинин	1702,2 ± 178,4	1867,3 ± 160,3	1134,2 ± 186,9	1326,2 ± 269,6	1772,5 ± 234,3	1768,9 ± 231,4	1607,8 ± 234,1	1653,3 ± 411,2	2300,0 ± 154,0	1366,1 ± 171,8	2030,0 ± 193,9	2756,0 ± 205,0
Аспарагин	2068,8 ± 66,7	1768,6 ± 76,7	1497,2 ± 188,9	2458,6 ± 133,4	2190 ± 145,5	2967,7 ± 302,2	2705,7 ± 308,6	2296,7 ± 76,7	2153,8 ± 64,4	2258,1 ± 33,1	2225,2 ± 116,1	2171,4 ± 65,5
Аспарагиновая кислота	4028,1 ± 324,9	4677,9 ± 828,8	6889,6 ± 641,6	3126,9 ± 577,3	3282,5 ± 224,2	3898,2 ± 289,2	4269,2 ± 286,0	4000,0 ± 853,8	4278,1 ± 510,1	4391,1 ± 542,4	6361,7 ± 615,9	4786,1 ± 242,6
Валин	5565,9 ± 168,4	5022,0 ± 187,0	6112,5 ± 473,6	4767,7 ± 668,5	5489,5 ± 234,1	7689,2 ± 693,7	7380,1 ± 600,9	5863,3 ± 318,4	5364,4 ± 77,4	6184,9 ± 282,9	5554,6 ± 191,8	5875,2 ± 156,2
Гистидин	3525,2 ± 92,5	3146,7 ± 157,3	3663,3 ± 262,2	2929,2 ± 330,9	3496,0 ± 138,3	4661,9 ± 433,0	4506,7 ± 332,3	3603,3 ± 197,6	3295,0 ± 95,8	3802,2 ± 177,6	3614,6 ± 102,9	3641,6 ± 55,4
Глицин	2535,6 ± 67,9	2144,0 ± 91,8	2610,8 ± 211,7	2153,8 ± 277,2	2555,5 ± 107,2	3642,4 ± 356,5	3534,15 ± 265,7	2990,0 ± 112,3	2577,5 ± 80,9	2742,1 ± 102,1	2571,8 ± 79,0	2548,0 ± 64,2
Глутаминовая кислота	4562,9 ± 286,8	5558,7 ± 581,6	5529,2 ± 257,3	3673,8 ± 594,9	3577,0 ± 231,3	4045,5 ± 293,2	4475,0 ± 292,4	4295,0 ± 989,8	4953,8 ± 468,0	5231,4 ± 426,0	7315,9 ± 449,9	5286,4 ± 274,0
Изолейцин	1152,9 ± 61,9	1074,3 ± 29,5	884,7 ± 58,4	1015,6 ± 85,3	652,7 ± 76,3	1490,4 ± 148,7	1570,6 ± 121,2	1096,7 ± 165,9	1121,3 ± 69,7	1120,5 ± 71,3	972,9 ± 71,3	1177,8 ± 39,6
Лейцин	7711,7 ± 272,0	6845,7 ± 204,9	7046,3 ± 181,9	8090,0 ± 549,5	7413,3 ± 197,7	10308,0 ± 1132,6	10443,6 ± 867,9	7120,0 ± 217,8	7085,6 ± 179,4	7640,5 ± 141,4	7500,8 ± 279,1	7977,4 ± 224,6
Лизин	6655,6 ± 323,9	5684,0 ± 212,2	7320,4 ± 679,2	5288,5 ± 594,3	6803,0 ± 303,3	8935,0 ± 758,5	9011,5 ± 507,1	7833,3 ± 575,1	6504,4 ± 146,8	7660,7 ± 364,5	6774,3 ± 216,4	6818,8 ± 107,2
Метионин	1509,6 ± 91,1	1192,7 ± 71,3	1553,3 ± 115,0	1538,5 ± 67,4	1971,0 ± 273,8	1824,5 ± 157,9	1758,1 ± 101,9	1458,3 ± 58,4	1320,0 ± 37,8	1379,3 ± 44,2	1301,0 ± 40,5	1396,8 ± 50,2
Пролин	2037,0 ± 105,5	1784,1 ± 78,7	2471,7 ± 249,2	1957,7 ± 229,1	2213,5 ± 102,2	2867,8 ± 198,4	2864,6 ± 177,9	2630,0 ± 145,8	2206,9 ± 42,6	2492,5 ± 114,1	2896,4 ± 267,1	3163,6 ± 750,5
Серин	3701,9 ± 210,4	3408,7 ± 143,1	3965,4 ± 311,7	3071,8 ± 423,7	3803,2 ± 203,8	4293,3 ± 261,0	4510,5 ± 193,1	4491,7 ± 420,7	3886,3 ± 139,8	4185,0 ± 214,8	4166,8 ± 150,1	4285,6 ± 99,2
Тирозин	871,5 ± 93,8	693,3 ± 71,4	1248,3 ± 206,1	640,8 ± 46,9	930,0 ± 136,8	1102,2 ± 169,4	1204,7 ± 146,8	1433,3 ± 391,8	943,8 ± 92,2	1238,6 ± 186,4	1019,6 ± 93,5	1004,8 ± 60,8
Треонин	3671,9 ± 197,7	3282,0 ± 116,8	4457,1 ± 482,5	3225,4 ± 321,9	3987,0 ± 234,5	5021,4 ± 381,6	5208,5 ± 276,8	4998,3 ± 472,7	3772,5 ± 119,2	4700,4 ± 323,2	3931,8 ± 104,6	3892,5 ± 102,6
Триптофан	1157,8 ± 38,9	1112,1 ± 31,8	1205,4 ± 61,1	1043,8 ± 91,5	1116,0 ± 72,4	1528,8 ± 114,6	1443,7 ± 66,7	1470,0 ± 161,3	1107,5 ± 18,7	1395,0 ± 89,4	1188,2 ± 39,3	1124,0 ± 32,3
Фенилаланин	4541,5 ± 185,1	4107,3 ± 178,7	4952,9 ± 360,2	3791,5 ± 480,1	4708,0 ± 181,9	5748,6 ± 436,7	6019,0 ± 363,7	4790,0 ± 253,6	5061,3 ± 109,4	4967,1 ± 171,7	4967,5 ± 187,9	5204,4 ± 127,5

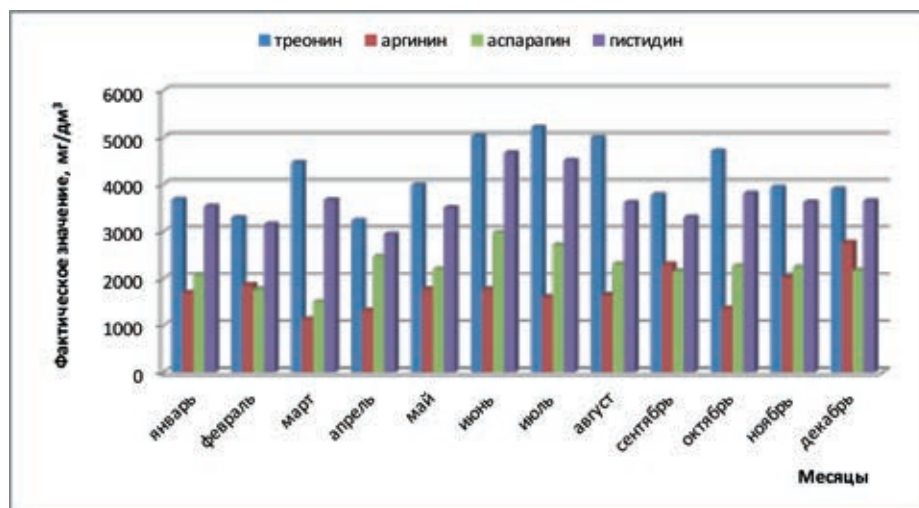


Рис. 3. Сезонная динамика аминокислотного состава ГБК (по аминокислотам треонин, аргинин, аспарагин и гистидин)

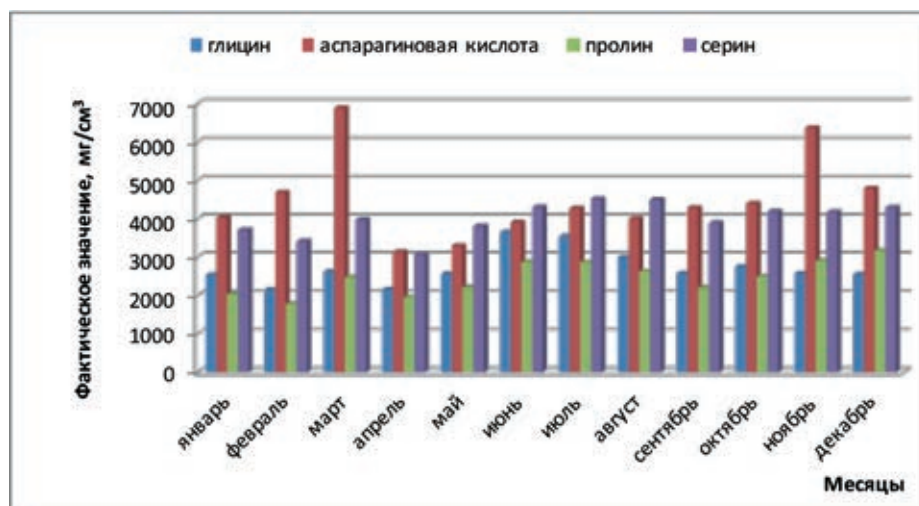


Рис. 4. Сезонная динамика аминокислотного состава ГБК (по заменимым аминокислотам глицин, аспарагиновая кислота, пролин, серин)

нов года процент следующих аминокислот оставался на постоянном уровне: тирозина (1–2%), изолейцина (1–2%), триптофана (2%), метионина (2–3%), аргинина (2–4%), аспарагина (2–4%), пролина (3–5%), валина (8–10%), глицина (4–5%), гистидина (4–6%), серина (5–7%), треонина (6–7%), фенилаланина (7–8%), аланина (8–10%), лизина (10–12%). Относительное содержание лейцина изменялось скачкообразно в марте – апреле с 10 до 15%, а на протяжении остального года оставалось в пределах 11–12%. В небольших пределах колебался процент содержания аспарагиновой и глутаминовой кислот. Так, в марте и ноябре количество каждой аминокислоты составляло 10% от общего числа, в остальное время снижалось до 5–6%.

Таким образом, при существенном изменении абсолютных показателей аминокислот их относительное количество в основном оставалось постоянным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований была изучена сезонная динамика аминокислотного состава гидролизата белков крови, которая напрямую зависела от сезона

заготовки сырья и физиолого-биохимических показателей крови КРС.

Максимальное содержание аминокислот было отмечено в летние месяцы, а в осенне-зимний период их количество понижалось. Исключение составляют глутаминовая и аспарагиновая кислоты, увеличение содержания которых приходится на ноябрь. Причиной этого, вероятно, является перевод животных на силосно-концентратный тип кормления.

Было отмечено, что при существенном изменении абсолютных показателей аминокислот их относительное количество в основном оставалось постоянным.

Полученные результаты предполагают проведение дальнейших исследований по изучению влияния сезонных изменений аминокислотного состава гидролизата белков крови на интенсивность прироста клеточной популяции и выход иммуногенных компонентов вируса ящура.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

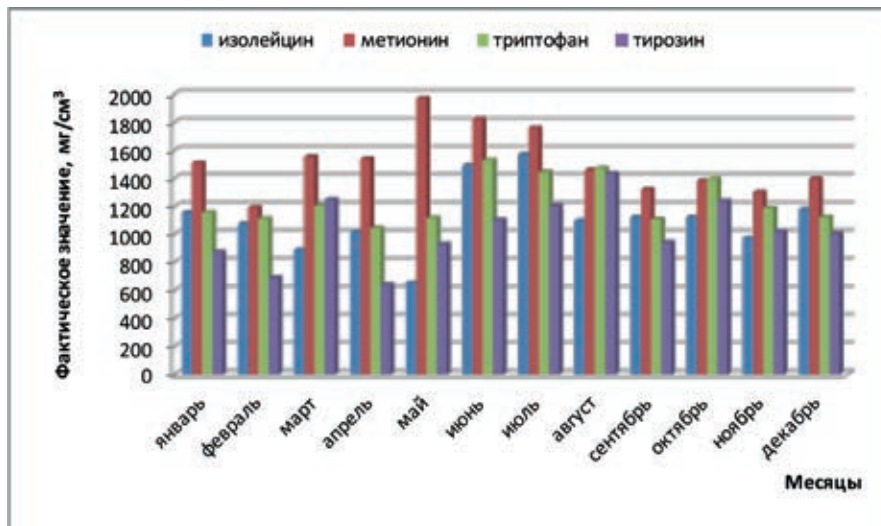


Рис. 5. Сезонная динамика аминокислотного состава ББК (по аминокислотам изолейцин, метионин, триптофан, тирозин)

2. Григорьев К. Н., Фоминцев К. А., Александрова С. С. Сезонные изменения морфологических и биохимических показателей крови у скота мясных пород // Эпоха науки. – 2016. – № 8. – С. 244–249.

3. Гудимо О. С., Колесникова Н. А., Шошиев Л. Н. Культивирование клеток HeLa на питательных средах с гидролизатами сыворотки крови человека и животных // Вопросы вирусологии. – 1961. – № 3. – С. 375–379.

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. – С. 148–151.

6. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М.: Спутник+, 2009. – 656 с.

7. Конохов 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. Макашова Т. А., Никифорова Т. А., Иванов А. А. Показатели крови молочных коров как отражение физиологического состояния животных // Вестник мясного скотоводства. – 2010. – Т. 1, № 63. – С. 85–94.

9. Матюшина Л. И., Оковитый А. С. Состав и свойства некоторых компонентов отечественных и зарубежных питательных сред // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов II конф. молодых ученых, посвящ. 110-летию со дня рождения В. И. Ленина, г. Владимир, 16–17 апреля 1980 г. – Владимир, 1980. – С. 11–13.

10. Некоторые особенности роста в суспензии монослойно-суспензионных клеток ВНК-21 / В. И. Родичкин, А. С. Оковитый, Г. А. Кудрявцева [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов II конф. молодых ученых, посвящ. 110-летию со дня рождения В. И. Ленина, г. Владимир, 16–17 апреля 1980 г. – Владимир, 1980. – С. 8–10.

11. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. – М.: Бином, 2011. – 633 с.

12. Николаев А. Я. Биологическая химия. – М.: МИА, 2004. – 566 с.

13. Плотников А. И. Совершенствование технологии содержания крупного рогатого скота // Инновационные технологии в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции: материалы междунар. науч.-практ. конф., Ставрополь, 20 мая 2016 г. – Ставрополь, 2016. – С. 15–19.

14. СТО 63462173-0002-2010. Гидролизат белков крови ферментативный. Технические условия. – Владимир, 2010.

REFERENCES

1. Glanc S. Methodical and biological statistics: translation from English [Mediko-biologicheskaja statistika: per. s angl.]. M.: Practica; 1998 (in Russian).

2. Grigor'ev K. N., Fomincev K. A., Aleksandrova S. S. Seasonal changes in morphological and biochemical parameters of meat cattle blood [Sezonnye izmeneniya morfologicheskikh i biohimicheskikh pokazatelej krovi u skota mjasnyh porod]. *Jepoha nauki*. 2016; 8: 244–249 (in Russian).

3. Gudimo O. S., Kolesnikova N. A., Shoshiev L. N. HeLa cell cultivation using nutrient media with human and animal blood serum hydrolysate

[Kul'tivirovanie kletok HeLa na pitatel'nyh sredah s gidrolizatami syvotki krovi cheloveka i zhivotnyh]. *Voprosy virusologii*. 1961; 3: 375–379 (in Russian).

4. D'jakonov L. P. Animal cell cultures: contemporary aspects of biotechnology and cell interaction with injected pathogens [Kul'tury kletok zhivotnyh: sovremennye aspekty biotekhnologii i vzaimodejstviya kletok s in'ekcionnymi patogenami]. *Citologija*. 1994; 36 (6): 503–504 (in Russian).

5. Ermakova N. V. Seasons and technological stress in animal husbandry [Sezonnost' i tehnologicheskij stress v zhivotnovodstve]. *Uchenye zapiski Orlovskogo gos. un-ta. Seriya: Estestvennye, tehnicheckie i medicinskie nauki*. 2014; 3 (59): 148–151 (in Russian).

6. Live cell in culture (methods and application in biotechnology) [Zhivotnaja kletka v kul'ture (metody i primenenie v biotekhnologii)]: pod red. L. P. D'jakonova. – M.: Sputnik+, 2009 (in Russian).

7. Konyuhov A. F. Metabolic demand of livestock cell culture and design of nutrient media basing on domestic components [Metabolicheskie potrebnosti kletochnyh kul'tur sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh i konstruirovaniye pitatel'nyh sred na osnove otechestvennyh komponentov]. *Veterinarnaja immunologija i biotekhnologija*. 1988; 66: 125–129 (in Russian).

8. Makashova T. A., Nikiforova T. A., Ivanov A. A. Milk cow blood parameters as reflection of animal physiological status [Pokazатели krovi molochnyh korov kak otrazhenie fiziologicheskogo sostojaniya zhivotnyh]. *Vestnik mjasnogo skotovodstva*. 2010; 1 (63): 85–94 (in Russian).

9. Matjushina L. I., Okovytyj A. S. Composition and properties of some domestic and foreign nutrient medium components [Sostav i svojstva nekotoryh komponentov otechestvennyh i zarubezhnyh pitatel'nyh sred]. *Aktual'nye problemy veterinarnoj virusologii: tezisy dokladov II konf. molodyh ucheny, posvjashh. 110-letiju so dnja rozhdenija V. I. Lenina, Vladimir, 16–17 aprelja 1980 Vladimir; 1980: 11–13 (in Russian).*

10. Rodichkin V. I., Okovytyj A. S., Kudrjavceva G. A. et al. Some peculiarities of growth in the suspension of BHK-21 monolayer-suspension cells [Nekotorye osobennosti rosta v suspenzii monoslojno-suspenzionnyh kletok BHK-21]. *Aktual'nye problemy veterinarnoj virusologii: tezisy dokladov II konf. molodyh ucheny, posvjashh. 110-letiju so dnja rozhdenija V. I. Lenina, Vladimir, 16–17 aprelja 1980 Vladimir; 1980: 8–10 (in Russian).*

11. Nel'son D., Koks M. Lehninger Principles of Biochemistry [Osnovy biohimii Lenindzhera]. Vol. 2. *Bioenergetika i metabolism*. M.: Binom, 2011 (in Russian).

12. Nikolayev A. Ya. Biological chemistry [Biologicheskaja himija]. M.: MIA; 2004 (in Russian).

13. Plotnikov A. I. Improvement of cattle management technology [Sovershenstvovanie tehnologii soderzhanija krupnogo rogatogo skota]. *Innovacionnye tehnologii v proizvodstve i pererabotke sel'skohozjajstvennoj produkcii: materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf., Stavropol', 20 maja 2016 Stavropol'; 2016: 15–19 (in Russian).*

14. СТО 63462173-0002-2010. Enzymic blood protein hydrolysate. Technical specifications [Gidrolizat belkov krovi fermentativnyj. Tehnicheckie uslovija]. Vladimir; 2010 (in Russian).

Поступила 10.02.18

Принята в печать 19.04.18

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ЙОДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА «ВАНГЦЕЙОД»

Т. В. Кручинкина¹, Ю. А. Гаврилов², Г. А. Гаврилова³

¹ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБНУ «ДальЗНИВИ», г. Благовещенск, Россия, e-mail: dalznivlabbiohim@mail.ru

² Профессор, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Дальневосточный ГАУ», г. Благовещенск, Россия

³ Профессор, доктор ветеринарных наук, ФГБОУ ВО «Дальневосточный ГАУ», г. Благовещенск, Россия

РЕЗЮМЕ

Амурская область относится к биогеохимической провинции с низким содержанием йода в почве, воде и воздухе, что приводит к поражению щитовидной железы у сельскохозяйственных животных, ослаблению иммунной системы и, следовательно, к повышенной чувствительности к заболеваниям. Разработан новый профилактический йодсодержащий препарат «Вангцейод» на основе природных цеолитов Вангинского месторождения для профилактики йодной недостаточности молодняка крупного рогатого скота. Отличительная особенность цеолита Вангинского месторождения в сравнении с цеолитовыми туфами других месторождений Амурской области и Дальнего Востока в том, что он представлен наиболее эффективными минералами ряда клиноптилолит–гейландит, характеризующимися низким содержанием вредных для организма соединений. При изучении безвредности препарата на белых мышах установлено, что препарат «Вангцейод» не обладает острой токсичностью. Включение его в течение двух месяцев в рацион белых мышей в дозах 1,0 и 2,0 г/кг массы признаков хронической интоксикации также не выявило, о чем свидетельствует 100%-я сохранность мышей в опытных группах по сравнению с контролем (57%). Скармливание мышам препарата в дозе 1,0 г/кг массы способствовало нормализации белкового и углеводного обменов.

Ключевые слова: йодная недостаточность, ослабление иммунной системы, биохимические показатели, профилактический йодсодержащий препарат.

UDC 619:615.326

TOXICOLOGIC CHARACTERISTICS OF THE PREVENTIVE IODINE-CONTAINING PREPARATION “VANGTSEYOD”

T. V. Kruchinkina¹, Yu. A. Gavrilov², G. A. Gavrilova³

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBNU “DalZNIIVI”, Blagoveshchensk, Russia, e-mail: dalznivlabbiohim@mail.ru

² Professor, Doctor of Science (Biology), FSEI Far Eastern Agrarian University, Blagoveshchensk, Russia

³ Professor, Doctor of Science (Veterinary Medicine) FSEI Far Eastern Agrarian University, Blagoveshchensk, Russia

SUMMARY

The Amur Oblast belongs to biogeochemical province with low contents of iodine in the soil, water and air, which leads to the thyroid gland disorders in animals, weakened immunity system and, consequently, to the increased sensitivity to diseases. A new iodine-containing preparation “Vangtseyod” has been developed basing on natural zeolites from Vanga deposits to prevent iodine deficit in young cattle. The distinctive feature of the Vanga deposit zeolite in comparison with other deposits of the Amur Oblast and the Far East is that it contains more effective clinoptilolite and heulandite minerals, characterized by the low contents of harmful compounds. Studies of the preparation safety performed on white mice showed that “Vangtseyod” does not have acute toxicity. It's inclusion into mice diet at 1.0 and 2.0 g/kg dose during two months did not induce any signs of chronic intoxication as 100% mice of experimental group survived in comparison with the control group (57%). Feeding mice with the preparation at 1.0 g/kg dose facilitated improved protein and carbohydrate metabolism.

Key words: iodine insufficiency, weakening of the immune system, preventive iodine-containing preparation.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания щитовидной железы у животных занимают особое положение в незаразной патологии за счет их широкого распространения и наносимого экономического ущерба. Длительный дефицит йода является основным этиологическим фактором возникновения эндемического зоба, вспышки которого сопровождаются значительным отходом молодняка (до 68%) от числа народившихся [5].

Амурская область относится к биогеохимической провинции с низким содержанием йода в почве, воде и воздухе, что приводит к поражению щитовидной железы у сельскохозяйственных животных. Установлено, что у молодняка крупного рогатого скота в зоне йодной недостаточности выявлены гипо- и диспротеинемия, гипогликемия, нарушения минерального обмена. Нарушения обменных процессов и иммунодефицитные состояния более всего бывают выражены у телят 10-суточного возраста и в дальнейшем усугубляются [2].

В настоящее время существует достаточно много препаратов для восполнения йода в организме животных. Однако их низкая эффективность объясняется тем, что йод, стабилизированный калием, непрочно соединяется с ним, в связи с чем срок хранения препаратов ограничен.

Природные цеолиты эффективно используются в ветеринарии для профилактики и лечения незаразных болезней [1]. Цеолиты обладают буферными, ионообменными и сорбционными свойствами, являются источником многих макро- и микроэлементов, способны иммобилизовать ферменты желудочно-кишечного тракта, тем самым повышая их активность и стабильность [3]. Цеолиты способны пролонгировать действие лекарственных средств, являются хорошими стабилизаторами. Отмечено их положительное влияние на уровень естественной резистентности и иммунный статус организма животных [4].

В Амурской области выявлено и разведано более 10 месторождений цеолитов, из них самые перспективные для использования в сельском хозяйстве – Вангинское и Куликовское.

По петрографическим характеристикам цеолиты Вангинского месторождения относятся к гейландит-клиноптилолитам, которые в сравнении с цеолитовыми туфами других месторождений Амурской области и Дальнего Востока имеют более эффективный состав и низкое содержание вредных для организма соединений.

Для повышения естественной резистентности и нормализации обменных процессов у молодняка крупного рогатого скота был разработан профилактический йодсодержащий препарат на основе природных цеолитов Вангинского месторождения.

Цель работы – изучение токсикологических свойств разработанного препарата «Вангцейод».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в лаборатории биохимии и ветеринарии Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института.

Изучение острой и хронической токсичности профилактического йодсодержащего препарата «Вангцейод» проводили на белых мышах. При определении острой токсичности препарат скармливали мышам в смеси с кормом. Начальная доза препарата составляла 1,0 г/кг массы, которая через двое суток составила 2,0 г/кг, затем – 4,0 г/кг, в дальнейшем дозу препарата (каждые двое суток) увеличивали в два раза, чтобы определить среднюю летальную дозу LD50. Хроническую токсичность препарата изучали на мышах массой 20–22 г при однократном введении с кормом в дозах 1,0 и 2,0 г/кг массы. Срок опыта – 60 сут.

Общее действие препарата на организм лабораторных животных оценивали по клиническому состоянию животных, морфологическим и биохимическим показателям крови.

В крови определяли количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина. Общий белок определяли по биуретовой реакции, глюкозу, мочевины, кальций, фосфор – спектрофотометрическим методом с использованием готовых наборов реактивов для определения указанных субстратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скармливание мышам препарата в начальной дозе 1,0 г/кг массы не оказало влияния на общее состояние животных. Мыши полностью съедали корм, были подвижны, активно проявляли живую реакцию на окружающих. В максимальной дозе 16,0 г/кг мыши съели 47,6% препарата. Признаков интоксикации не установлено – животные были подвижны, активно реагировали на внешние раздражители. До начала и после окончания опыта у животных опытной и контрольной групп определяли массу, и по завершении опыта была взята кровь для морфологических и биохимических исследований.

Признаки острой интоксикации у мышей отсутствовали, о чем свидетельствуют гематологические и биохимические показатели крови мышей обеих групп (табл. 1). При анализе гематологических показателей крови животных опытной группы по сравнению с контролем отмечали достоверное увеличение гемоглобина на 13% ($p < 0,01$). Уровни эритроцитов и лейкоцитов у мышей опытной группы были выше, чем у контрольной, в 1,2 и 1,3 раза соответственно, но оставались в пределах физиологической нормы. При био-

Таблица 1
Гематологические и биохимические показатели крови мышей при включении в рацион препарата «Вангцейод»

Показатели	Группа животных	
	контрольная (n = 7)	опытная (n = 10)
Эритроциты, $10^{12}/л$	$4,94 \pm 0,36$	$5,75 \pm 0,33$
Лейкоциты, $10^9/л$	$4,68 \pm 0,52$	$6,33 \pm 1,35$
Гемоглобин, г/л	$125,97 \pm 3,58$	$142,37 \pm 4,02$
Общий белок, г/л	$56,80 \pm 1,13$	$61,9 \pm 1,43$
Мочевина, мм/л	$4,81 \pm 0,34$	$4,98 \pm 0,29$
Глюкоза, мм/л	$5,93 \pm 0,34$	$5,16 \pm 0,45$
Кальций общ., мм/л	$2,24 \pm 0,10$	$2,32 \pm 0,04$
Фосфор неорг., мм/л	$2,03 \pm 0,09$	$2,19 \pm 0,17$



Рис. 1. Мыши опытной группы (40 сут от начала эксперимента)



Рис. 2. Мыши контрольной группы (40 сут от начала эксперимента)

химическом исследовании сыворотки крови животных установлено, что содержание общего белка у мышей, получавших препарат, по сравнению с контролем достоверно увеличилось на 9% ($p < 0,05$) и соответствует физиологической норме. Определить среднелетальную дозу (LD50) не представилось возможным, так как гибель мышей от приема препарата в максимальной дозе отсутствовала.

Анализ динамики массы белых мышей выявил положительный ее прирост как в контрольной, так и в опытной группах. Так, в группе, получавшей йодсодержащий препарат, прирост составил 9,2%, в контрольной – 4,8%. Следовательно, животные, получавшие препарат, росли интенсивнее в сравнении с контролем (разница составила 4,4%).

Таким образом, введение в рацион белых мышей профилактического йодсодержащего препарата на основе природных цеолитов не оказало отрицательного влияния на биохимические и гематологические пока-

затели крови животных, способствовало увеличению среднесуточного прироста живой массы мышей, что свидетельствует о его безвредности.

Включение в рацион белых мышей профилактического препарата в дозах 1,0 и 2,0 г/кг массы через 60 сут не выявило признаков хронической токсичности. В течение всего опыта мыши были подвижны, активно проявляли живую реакцию на окружающих, полностью поедали корм, слизистые оболочки ротовой полости были розовые, шерстяной покров гладкий, блестящий (рис. 1).

В контрольной группе у мышей наблюдали выпадение шерстяного покрова, мыши вели себя агрессивно, поедали свое потомство, нападали на более слабых (рис. 2). Сохранность в контрольной группе составила 57,1%, в опытной – 100%.

Подтверждением отсутствия хронической интоксикации при скормливания профилактического препарата являлись гематологические и биохимические

Таблица 2

Гематологические и биохимические показатели крови мышей через 60 сут после скармливания препарата

Показатели	Группа животных		
	контрольная (n = 4)	первая опытная, 1,0 г/кг (n = 5)	вторая опытная, 2,0 г/кг (n = 5)
Эритроциты, $10^{12}/л$	$7,93 \pm 0,53$	$6,78 \pm 0,79$	$7,08 \pm 0,26$
Лейкоциты, $10^9/л$	$4,44 \pm 1,63$	$4,20 \pm 0,46$	$3,95 \pm 0,77$
Гемоглобин, г/л	$129,60 \pm 1,76$	$127,94 \pm 2,23$	$130,04 \pm 4,92$
Общий белок, г/л	$61,88 \pm 7,34$	$68,76 \pm 4,25$	$64,13 \pm 2,69$
Альбумины, г/л	$28,43 \pm 1,56$	$34,06 \pm 1,02^*$	$35,53 \pm 2,60^*$
Мочевина, мм/л	$2,46 \pm 0,54$	$2,34 \pm 0,15$	$2,59 \pm 0,60$
Глюкоза, мм/л	$3,83 \pm 0,15$	$6,01 \pm 0,74^*$	$3,73 \pm 0,46$
Кальций общ., мм/л	$1,17 \pm 0,08$	$1,49 \pm 0,06^*$	$1,35 \pm 0,15$
Фосфор неорг., мм/л	$2,07 \pm 0,29$	$1,78 \pm 0,19$	$2,03 \pm 0,11$

* $p < 0,05$

показатели крови опытных и контрольных мышей (табл. 2).

Показатели эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина в крови животных опытных групп и контроля не имели достоверных различий.

У мышей опытных групп в сыворотке крови отмечали увеличение общего белка на 6,8 и 2,3 г/л и содержание альбуминов на 5,6 и 7,1 г/л по сравнению с контролем. Содержание глюкозы в сыворотке крови мышей первой опытной группы в сравнении с контролем выше на 56,9%. Скармливание мышам профилактического препарата в дозе 1,0 г/кг массы способствовало нормализации белкового и углеводного обменов.

Содержание кальция и фосфора в сыворотке крови мышей опытных и контрольных групп существенно не отличалось.

Таким образом, профилактический препарат не обладает хронической токсичностью для белых мышей. Дозу препарата 1,0 г/кг можно считать оптимальной, так как биохимические показатели крови мышей, получавших препарат в указанной дозе и в дозе 2,0 г/кг, не имеют достоверных отличий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный профилактический йодсодержащий препарат «Вангцейод» не обладает острой и хронической токсичностью. Включение в рацион белых мышей препарата в дозах 1,0 и 2,0 г/кг массы в течение двух месяцев не выявило признаков хронической интоксикации, о чем свидетельствует 100%-я сохранность мышей в опытных группах по сравнению с контролем (57%). Скармливание мышам профилактического препарата в дозе 1,0 г/кг массы способствовало нормализации белкового и углеводного обменов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белкин Б. Л. Влияние хотынецких природных цеолитов на физиологические функции, иммунологические показатели и продуктивность животных и птицы // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Ульяновск, 2003. – Т. 2. – С. 87–88.

2. Гаврилов Ю. А., Кручинкина Т. В. Влияние йодной недостаточности на показатели естественной резистентности молодняка КРС Амурской области // Веткорм. – 2013. – № 2. – С. 26–27.

3. Идиатуллин Ф. И. Перспективы использования сорбентов в свиноводстве // Материалы науч.-производ. конференции по актуал. проблемам ветеринарии и зоотехнии. – Казань, 2001. – Ч. 2. – С. 240–241.

4. Шадрин А. М. Природные цеолиты Сибири в животноводстве, ветеринарии и охране окружающей среды. – Новосибирск: Рос. акад. с.-х. наук. Сиб. отд.-ние. Ин-т эксперим. ветеринарии Сибири и Дал. Востока, 1998. – С. 13–15.

5. Шкуратова И. А., Ряпосова М. В., Дроздова Л. И. Морфофункциональные особенности щитовидной железы у крупного рогатого скота в разных экологических зонах // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: материалы Междунар. науч.-производ. конф., посвящ. 100-летию проф. А. А. Авророва. – Воронеж, 2006. – С. 226–230.

REFERENCES

1. Belkin B. L. Influence of Hotynets natural zeolites on physiological functions, immunological criteria and productivity of animals and birds [Vliyanie hotyneckikh prirodnykh ceolitov na fiziologicheskie funktsii, immunologicheskie pokazateli i produktivnost' zhivotnykh i pticy]. Aktual'nye problemy veterinarnoy meditsiny: materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf. Ulyanovsk; 2003; 2: 87–88 (in Russian).

2. Gavrilov Yu. A., Kruchinkina T. V. Influence of iodine deficit on characteristics of natural resistance of young cattle in Amur Oblast [Vliyanie yodnoy nedostatochnosti na pokazateli estestvennoy rezistentnosti molodnjaka KRS Amurskoy oblasti]. Veterinariya i kormlenie. 2013; 2: 26–27 (in Russian).

3. Idiatullin A. I. Prospects of sorbent use in pig production [Perspektivy ispol'zovaniya sorbentov v svinovodstve]. Materialy nauch.-produkt. konferentsii po aktual. problemam veterinarii i zootehnii. Kazan; 2001; 2: 240–241 (in Russian).

4. Shadrin A. M. Use of natural zeolites of Siberia in livestock production, veterinary medicine and environmental protection [Prirodnye ceolity Sibiri v zhivotnovodstve, veterinarii i ohrane okruzhayushhej sredy]. Novosibirsk: Russian academy of agricultural science. Siberian Department. Institute of experimental veterinary medicine of Siberia and Far East; 1998: 13–15 (in Russian).

5. Shkuratova I. A., Ryaposova M. V., Drozdova L. I. Morphofunctional characteristics of thyroid gland in cattle in different ecological zones [Morfofunktsional'nye osobennosti shhitovidnoy zhelezy u krupnogo rogatogo skota v raznykh ekologicheskikh zonakh]. Aktual'nye problemy veterinarnoy patologii i morfologii zhivotnykh: Materialy of the International Scientific and production conference devoted to the 100th anniversary of Professor A. A. Avrorov. Voronezh; 2006: 226–230 (in Russian).

Поступила 22.03.18

Принята в печать 11.05.18

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ВЕТОМ 21.77» НА БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ

Э. Р. Рафикова

Аспирант, ФГБОУ ВО «Новосибирский ГАУ», г. Новосибирск, Россия, e-mail: pchelka_leta@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Известно, что хищные грибы-гифомицеты играют важную роль в системе профилактических мероприятий при гельминтозах. Отмечено, что сведения о свойствах и влиянии на организм животных соединений, содержащихся в хищных грибах, немногочисленны. Представлены результаты исследования по определению влияния нового микробиологического препарата «Ветом 21.77» на основе *Duddingtonia flagrans* на биохимический профиль сыворотки крови лабораторных мышей. Препарат назначали животным в дозах 2, 5, 50 и 300 мкл/кг массы. Контроль изучаемых показателей производили до исследования, через 2 и 7 сут после ежедневного применения препарата. Во всех опытных группах показатели сохранялись в пределах физиологической нормы, как и в контрольной, где препарат не применяли. Результаты исследования свидетельствуют о безвредности микробиологического препарата. У мышей, получающих максимальную дозу препарата, регистрировали достоверное увеличение содержания общего белка и альбумина в сравнении с аналоговыми из контроля.

Ключевые слова: «Ветом», биохимический профиль, мыши, *Duddingtonia flagrans*.

ВВЕДЕНИЕ

Среди естественных регуляторов численности гельминтов можно отдельно рассматривать грибы-гифомицеты, проявляющие хищническую активность по отношению к паразитам. Гифомицеты являются объектом довольно большого количества исследовательских работ, которые продолжают проводиться учеными многих стран. К преимуществам использования таких грибов относят, в частности, их присутствие практически во всех частях мира и во всех климатических зонах [5]. Согласно имеющимся литературным данным, эти гельминтофаги, находясь в микросредах с нематодами, в течение 24 часов формируют ловчие органы [12], которые способны не просто захватывать нематоды, но также адгезировать к ним и таким образом эффективно распространяться по ареалу обитания паразитов [9]. Дополнительное преимущество данных хищников заключается в безопасности для организма хозяина [7].

Одним из наиболее эффективных представителей гифомицетов является хищный гриб *Duddingtonia flagrans* из семейства *Orbiliaceae* [10, 11]. Спектр эффективности этого нематофага, как показывают результаты различных исследований, не ограничивается противопаразитарным действием: к примеру, применение изолята *D. flagrans* совместно с *Saccharomyces cerevisiae*, помимо снижения паразитарной нагрузки, привело к повышению молочной продуктивности коров [6].

У всех видов *Arthrobotrys* до 80% липидного состава представлено триглицеридами, в том числе пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислотами; до 12% липидов в грибах этого рода составляют стеролы, необходимые, вероятно, для образования латексоподобных вязких и клейких веществ, концентрирующихся на поверхности ловчих колец «хищного» мицелия [1]. Данное обстоятельство дает основания предполагать возможные изменения в биохимических показателях белково-липидного обмена мышей в результате скормливания им спорово-мицелиальной биомассы *D. flagrans*.

Выявленное Т. В. Тепляковой посредством рентгеновского микроанализа повышенное содержание в «хищном» мицелии кальция (участвующего, согласно гипотезе автора, в процессах клеточных сокращений, протекающих при актах хищничества грибов), а также калия и фосфора [4] вызвало интерес и сподвигло включить ряд электролитов в список изучаемых показателей.

Вообще же, ввиду немногочисленности имеющихся в научной литературе сведений о свойствах содержа-

UDC 619:615.038

EFFECT OF "VETOM 21.77" PREPARATION ON SERUM BIOCHEMICAL PATTERN IN MICE

E. R. Rafikova

Post-Graduate Student, FGBEE "Novosibirsk Agricultural University", Novosibirsk, Russia, e-mail: pchelka_leta@mail.ru

SUMMARY

It is known that predatory *Hyphomycetes* fungi play an important role in measures taken for helminthic infestation prevention. There is little evidence on properties of compounds contained in predatory fungi and their effect on animals. Results of tests of "Vetom 21.77", new microbiological preparation based on *Duddingtonia flagrans*, for its effect on serum biochemical pattern of laboratory mice are presented. The preparation was administered to the animals at the dose of 2, 5, 50 and 300 µl/kg of body weight. The animals were examined for tested parameters prior and 2 and 7 days after daily administration of the preparation. The parameters remained within the normal physiological limits in all test group as well as in control group not given the preparation. The test results indicated safety of the said microbiological preparation. Significant increase in total protein and albumin contents was recorded in mice given the maximum dose of the preparation as compared with those of control group.

Key words: "Vetom", biochemical pattern, mice, *Duddingtonia flagrans*.

Таблица 1
Биохимические показатели крови лабораторных животных до исследования ($n = 5, x \pm \mu$)

Показатель	Результат исследования	Норма
Общий белок (г/л)	$48,60 \pm 0,24$	43–64
Альбумин (г/л)	$22,93 \pm 0,18$	20–47
Мочевина (ммоль/л)	$5,04 \pm 0,08$	4,3–10,0
Билирубин общий (мг/дл)	$0,21 \pm 0,03$	0,1–0,9
АЛТ (МЕ/л)	$49,20 \pm 0,66$	26–120
АСТ (МЕ/л)	$120,0 \pm 1,3$	69–191
Глюкоза (ммоль/л)	$7,98 \pm 0,09$	5,9–15,4
Фосфор (ммоль/л)	$2,20 \pm 0,03$	2–4
Кальций (ммоль/л)	$2,48 \pm 0,03$	2,3–3,0
Калий (ммоль/л)	$6,98 \pm 0,05$	5–9
Натрий (ммоль/л)	$152,06 \pm 1,30$	147–167
Холестерин общий (ммоль/л)	$3,31 \pm 0,03$	1,6–4,5
Креатинин (ммоль/л)	$0,05 \pm 0$	0,04–0,07

щихся в хищных грибах соединений (таких как сесквитерпены и фосфолипиды) применительно к организму животных, в настоящем исследовании было решено использовать как можно более широкий спектр биохимических показателей.

Цель работы заключалась в исследовании влияния микробиологического препарата «Ветом 21.77», содержащего спорово-мицелиальную биомассу *D. flagrans*, на биохимический профиль сыворотки крови лабораторных мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-экспериментальное исследование проводили на базе Научно-исследовательской ветеринарной лаборатории агротехнопарка при Государственном университете им. Шакарима (г. Семей, Казахстан).

Опытный образец – микробиологический препарат «Ветом 21.77», представляющий собой лиофилизированный изолят апатогенного нематофагового гриба *D. flagrans* на сухих иммобилизующих носителях, обладающих пребиотическими, сорбирующими и анти-токсическими свойствами.

Исследование биохимических показателей сыворотки крови осуществляли на 105 нелинейных лабораторных мышах весом $19,8 \pm 0,3$ г. Для проведения эксперимента были сформированы 5 групп животных – контрольная и четыре опытные – по 20 голов в каждой. Также дополнительно использовали 5 мышей для биохимического анализа, который провели до начала исследования. В опытных группах препарат применяли в дозах 2, 5, 50 и 300 мкл/кг массы. Животные контрольной группы препарат не получали. Контроль изучаемых показателей производили до исследования, а затем через 2 и 7 сут после ежесуточного применения препарата в вышеуказанных дозах животными опытных групп.

Ежедневно проводили клинический осмотр мышей, фиксируя в индивидуальных картах данные о внешнем виде каждого животного, поведении, потреблении корма, изменении массы тела.

Таблица 2
Биохимические показатели крови лабораторных животных через 2 суток от начала исследования ($n = 50, x \pm \mu$)

Показатель	Результат исследования					Норма
	контрольная	опытная 1 (2 мкл/кг)	опытная 2 (5 мкл/кг)	опытная 3 (50 мкл/кг)	опытная 4 (300 мкл/кг)	
Общий белок (г/л)	$48,80 \pm 0,2$	$48,80 \pm 0,37$	$48,80 \pm 0,37$	$49,20 \pm 0,37$	$49,20 \pm 0,37$	43–64
Альбумин (г/л)	$23,16 \pm 0,11$	$23,18 \pm 0,11$	$23,17 \pm 0,13$	$23,29 \pm 0,07$	$23,43 \pm 0,09$	20–47
Мочевина (ммоль/л)	$5,09 \pm 0,07$	$5,12 \pm 0,05$	$5,10 \pm 0,08$	$5,11 \pm 0,05$	$5,12 \pm 0,07$	4,3–10
Билирубин общий (мг/дл)	$0,22 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	0,1–0,9
АЛТ (МЕ/л)	$49,60 \pm 0,51$	$49,60 \pm 0,68$	$49,80 \pm 0,49$	$49,60 \pm 0,75$	$49,80 \pm 0,58$	26–120
АСТ (МЕ/л)	$120,80 \pm 1,43$	$121,2 \pm 1,5$	$121,60 \pm 1,81$	$122,00 \pm 1,87$	$122,60 \pm 1,44$	69–191
Глюкоза (ммоль/л)	$8,02 \pm 0,05$	$8,00 \pm 0,05$	$7,97 \pm 0,06$	$7,99 \pm 0,09$	$7,98 \pm 0,07$	5,9–15,4
Фосфор (ммоль/л)	$2,21 \pm 0,02$	$2,19 \pm 0,03$	$2,21 \pm 0,04$	$2,20 \pm 0,04$	$2,21 \pm 0,03$	2–4
Кальций (ммоль/л)	$2,50 \pm 0,04$	$2,47 \pm 0,06$	$2,49 \pm 0,03$	$2,52 \pm 0,03$	$2,51 \pm 0,05$	2,3–3,0
Калий (ммоль/л)	$7,00 \pm 0,06$	$6,99 \pm 0,03$	$7,00 \pm 0,05$	$7,00 \pm 0,04$	$7,02 \pm 0,04$	5–9
Натрий (ммоль/л)	$151,67 \pm 0,71$	$151,45 \pm 0,84$	$152,48 \pm 1,01$	$151,46 \pm 0,97$	$152,38 \pm 0,75$	147–167
Холестерин общий (ммоль/л)	$3,34 \pm 0,03$	$3,33 \pm 0,04$	$3,30 \pm 0,04$	$3,31 \pm 0,05$	$3,32 \pm 0,03$	1,6–4,5
Креатинин (ммоль/л)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04–0,07

Таблица 3

Биохимические показатели крови лабораторных животных через 7 суток от начала исследования
($n = 50, x \pm \mu$)

Показатель	Результат исследования					Норма
	контрольная	опытная 1 (2 мкл/кг)	опытная 2 (5 мкл/кг)	опытная 3 (50 мкл/кг)	опытная 4 (300 мкл/кг)	
Общий белок (г/л)	49,2 ± 0,2	49,4 ± 0,24	49,40 ± 0,24	50,20 ± 0,58	50,60 ± 0,51*	43–64
Альбумин (г/л)	23,5 ± 0,1	23,54 ± 0,15	23,64 ± 0,10	23,90 ± 0,17	23,95 ± 0,10*	20–47
Мочевина (ммоль/л)	5,16 ± 0,11	5,18 ± 0,07	5,19 ± 0,06	5,22 ± 0,08	5,30 ± 0,09	4,3–10
Билирубин общий (мг/дл)	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,1–0,9
АЛТ (МЕ/л)	50,20 ± 0,37	50,60 ± 0,51	50,60 ± 0,51	51,00 ± 0,45	51,00 ± 0,55	26–120
АСТ (МЕ/л)	123,00 ± 1,26	123,20 ± 1,07	123,60 ± 1,25	124,40 ± 1,21	124,60 ± 1,17	69–191
Глюкоза (ммоль/л)	8,00 ± 0,11	7,99 ± 0,08	7,97 ± 0,07	7,88 ± 0,07	7,82 ± 0,08	5,9–15,4
Фосфор (ммоль/л)	2,21 ± 0,04	2,20 ± 0,04	2,24 ± 0,03	2,22 ± 0,03	2,24 ± 0,05	2–4
Кальций (ммоль/л)	2,52 ± 0,03	2,53 ± 0,03	2,55 ± 0,03	2,57 ± 0,03	2,58 ± 0,03	2,3–3,0
Калий (ммоль/л)	7,06 ± 0,05	7,01 ± 0,03	7,04 ± 0,04	7,10 ± 0,07	7,08 ± 0,05	5–9
Натрий (ммоль/л)	151,74 ± 0,72	151,67 ± 1,18	152,30 ± 1,33	151,83 ± 0,87	152,27 ± 0,92	147–167
Холестерин общий (ммоль/л)	3,31 ± 0,03	3,29 ± 0,04	3,30 ± 0,05	3,25 ± 0,04	3,23 ± 0,07	1,6–4,5
Креатинин (ммоль/л)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04–0,07

* $p < 0,05$.

Взятие крови для исследования проводили в одно и то же время натошак общеизвестными методами [2, 8]. При проведении эксперимента использовали технику взятия крови непосредственно из сердечной мышцы, предварительно умерщвляя животных гуманным способом, по 5 мышей до начала исследования и по 10 мышей из каждой группы через 2 и 7 сут.

Биохимические исследования сыворотки крови проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Minitecno (I.S.E. S.r.l., Италия) и полуавтоматическом биохимическом анализаторе Stat Fax 3300 (Awareness Technology, США). Исследовали следующие биохимические показатели сыворотки крови: общий белок (г/л), альбумин (г/л), мочевину (ммоль/л), билирубин общий (мг/дл), АЛТ (МЕ/л), АСТ (МЕ/л), глюкозу (ммоль/л), фосфор (ммоль/л), кальций (ммоль/л), калий (ммоль/л), натрий (ммоль/л), общий холестерин (ммоль/л), креатинин (ммоль/л).

Полученные экспериментальные данные были обработаны с использованием программного обеспечения StatsDirect 3.1.15 (StatsDirect Ltd, UK). Сравнение выборок проводили с помощью одностороннего *U*-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении эксперимента зарегистрирована 100%-я сохранность подопытных животных. Физиологическое состояние мышей контрольной и опытных групп было в пределах нормы.

Результаты основных биохимических показателей крови мышей, полученные до начала научно-экспери-

ментального исследования, представлены в таблице 1. Установлено, что по всем показателям значения были в пределах допустимых физиологических норм, принятых для лабораторных мышей.

Значения биохимических показателей сыворотки крови животных опытных групп через 2 сут после применения препарата также оставались в пределах физиологической нормы. Уровень статистической значимости различий между значениями интактной контрольной и опытных групп животных достигнут не был (табл. 2).

На 7-е сутки эксперимента значения общего белка в сыворотке крови животных 1-й и 2-й опытных групп на 0,4% превышали аналоговые в контроле; в 3-й опытной группе показатель был выше на 2%, а в 4-й, где препарат назначали в дозе 300 мкл/кг, – на 2,8% ($p < 0,05$), превзойдя контрольную величину в статистически значимой степени (табл. 3).

Увеличение данного показателя может свидетельствовать об интенсификации белкового обмена у исследуемых мышей с преимущественным преобладанием анаболических процессов в организме животных [3].

Альбуминовая фракция также значительно превышала контрольное значение в 4-й опытной группе на 1,9% ($p < 0,05$). В 1-й опытной группе показатель был выше на 0,2, во 2-й – 0,4, в 3-й – 1,7%,

На данном этапе исследования регистрировали последовательное увеличение содержания мочевины в сыворотке крови мышей всех опытных групп на 0,4–2,7% относительно контроля, в зависимости от уровня дозы применяемого препарата. Известно, что моче-

вина и креатинин являются продуктами метаболизма аминокислот. Сывороточные концентрации данных метаболитов коррелируют с состоянием мышечной ткани [13].

В отношении электролитов наблюдалась относительно равномерная стабильная картина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного исследования установлено, что при применении препарата «Ветом 21.77» в дозах 2, 5, 50 и 300 мкл/кг массы биохимические показатели сыворотки крови мышей оставались в пределах физиологической нормы, как и в контрольной группе, где препарат не применяли. По окончании исследования у мышей 4-й опытной группы регистрировали статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение концентраций общего белка и альбумина в сыворотке крови. Данные биохимические показатели были выше по сравнению с аналогами контрольной группы. Клиническая значимость подобных результатов может быть подвергнута сомнению, однако представляется возможным утверждать о наличии тенденции к положительным сдвигам в указанных показателях при применении соответствующих доз микробиологического препарата.

Показатели сыворотки крови у всех подопытных животных изменялись по одинаковой закономерности в пределах физиологической нормы соответственно физиологическому статусу. На протяжении научно-экспериментального исследования побочных действий, воспалительных и аллергических реакций, связанных с применением препарата, не выявлено.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю, заслуженному деятелю науки Новосибирской области, заслуженному работнику высшей школы РФ, заведующему кафедрой фармакологии и общей патологии (НГАУ) доктору ветеринарных наук, профессору Ноздрину Григорию Антоновичу.

Автор благодарит руководителя центра ветеринарии агротехнопарка Государственного университета им. Шакарима (г. Семей, Казахстан) доцента Байгазанова Абдрахмана Нурмухамбетовича за предоставление материально-технической базы, а также кандидата ветеринарных наук Боярченко Елену Константиновну.

Отдельную благодарность выражает педагогу высшей квалификационной категории Рафиковой Рашиде Шаукатовне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беккер З. Э. Физиология и биохимия грибов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 230 с.
2. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / под ред. проф. И. П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.

3. Середа Т. И., Дерхо М. А. Оценка роли аминотрансфераз в формировании продуктивности у кур-несушек // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 2. – С. 72–77.
4. Теплякова Т. В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомикетов. – Новосибирск, 1999. – 252 с.
5. Теплякова Т. В. Грибы выходят на охоту // Наука из первых рук. – 2012. – № 5 (47). – С. 44–53.
6. Ahmad R. Z., Gholib D. The treatment of *Duddingtonia flagrans* and *Saccharomyces cerevisiae* increase milk production and decrease worm population in cow // Jurnal Veteriner. – 2014. – Vol. 15, No. 2. – P. 221–229.
7. Biology of conidial fungi / ed. G. T. Cole. – Elsevier, 2012. – 680 p.
8. Danneman P. J., Suckow M. A., Brayton C. The Laboratory Mouse. – 2nd ed. – Boca Raton: CRC Press, 2012. – P. 164–165.
9. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences / Y. Yang, E. Yang, Z. An, X. Liu // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, No. 20. – P. 8379–8384.
10. *In vitro* nematophagous activity of predatory fungi on infective nematodes larval stage of strongyloidea family / M. Zarrin, M. Rahdar, F. Poormohamadi, A. Rezaei-Matehkolaei // J. Med. Sci. – 2017. – Vol. 5, No. 3. – P. 281–284.
11. *In vitro*, *in vivo*, and interaction studies of nematophagous fungus *Arthrobotrys thauwasia* (*Monacrosporium thauwasium*) with the larvae of trichostrongylids of sheep / B. B. Wang, K.-Z. Cai, Q. Xu [et al.] // J. Parasitol. – 2017. – Vol. 103, No. 6. – P. 692–698.
12. Poinar G. O. Diseases of Nematodes. – Boca Raton: CRC Press, 2017. – Vol. 1. – 159 p.
13. Respiratory Care: Principles and Practice / D. R. Hess, N. R. MacIntyre, S. C. Mishoe [et al.]. – Jones & Bartlett Publishers, 2015. – 1520 p.

REFERENCES

1. Becker Z. E. Physiology and biochemistry of fungi [Fiziologija i biokhimiya gribov]. M.: Moscow University Press, 1988 (in Russian).
2. Methods for veterinary clinical laboratory diagnosis [Metody veterinarnoj klinicheskoj laboratornoj diagnostiki: spravocnik]. ed. by Prof. I. P. Kondrachina. M.: KolosS, 2004 (in Russian).
3. Sereda T. I., Derho M. A. The role of aminotransferase activity in hen productivity [Ocenka roli aminotransferaz v formirovanii produktivnosti u kur-nesushek]. *Sel'skoxozyajstvennaja biologija*. 2014; 2: 72–77 (in Russian).
4. Teplyakova T. V. Bio-ecological aspects of predatory *Hyphomycetes* fungi examination and use [Bioekologicheskie aspekty izucheniya i ispol'zovaniya hishchnyh gribov-gifomicetov]. Novosibirsk, 1999 (in Russian).
5. Teplyakova T. V. Fungi are on a hunt [Griby vyhodyat na ohotu]. *Nauka iz pervyh ruk*. 2012; 5 (47): 44–53 (in Russian).
6. Ahmad R. Z., Gholib D. The treatment with *Duddingtonia flagrans* and *Saccharomyces cerevisiae* increase milk production and decrease worm population in cow. *Jurnal Veteriner*. 2014; 15 (2): 221–229.
7. Biology of conidial fungi. ed. G. T. Cole. Elsevier; 2012.
8. Danneman P. J., Suckow M. A., Brayton C. The Laboratory Mouse. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2012: 164–165.
9. Yang Y., Yang E., An Z., Liu X. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (20): 8379–8384.
10. Zarrin M., Rahdar M., Poormohamadi F., Rezaei-Matehkolaei A. *In vitro* nematophagous activity of predatory fungi on infective nematodes larval stage of strongyloidea family. *J. Med. Sci*. 2017; 5 (3): 281–284.
11. Wang B. B., Cai K.-Z., Xu Q. et al. *In vitro*, *in vivo*, and interaction studies of nematophagous fungus *Arthrobotrys thauwasia* (*Monacrosporium thauwasium*) with the larvae of trichostrongylids of sheep. *J. Parasitol*. 2017; 103 (6): 692–698.
12. Poinar G. O. Diseases of Nematodes. Boca Raton: CRC Press, 2017; 1.
13. Hess D. R., MacIntyre N. R., Mishoe S. C. et al. Respiratory Care: Principles and Practice. Jones & Bartlett Publishers, 2015.

Поступила 26.03.18

Принята в печать 07.05.18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ТКАНЯХ ОРГАНОВ ПЧЕЛ КАК ПОКАЗАТЕЛЯ УРОВНЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

И. В. Сердюченко¹, Н. Н. Гугушвили²

¹ Доцент, кандидат ветеринарных наук, ФГБОУ ВО «КубГАУ им. И. Т. Трубилина», г. Краснодар, Россия, e-mail: serd-ira2013@yandex.ru

² Профессор, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «КубГАУ им. И. Т. Трубилина», г. Краснодар, Россия

РЕЗЮМЕ

Предложена новая методика определения содержания гликогена в тканях органов пчел, которая значительно отличается от существующих. Применяемый в настоящее время колориметрический метод по Хорейши является длительным и трудоемким, а кроме того, затратным, так как стоимость основного реактива – орцина – довольно высока. Сравнение экономической эффективности двух методов показало, что предлагаемая методика позволяет сократить затраты за счет использования более доступного и недорогого резорцина вместо орцина и сокращения общего времени проведения исследования с 4 до 3 ч 5 мин. Анализ содержания гликогена по усовершенствованной методике проведен на пчелах четырех пород: итало-карпатской, карпатской, приокской, серой горной кавказской. Установлено, что самые высокие показатели гликогена были у пчел приокской породы. Известно, что чем выше содержание гликогена в органах и тканях, тем лучше энергетический обмен у насекомых. Следовательно, пчелы приокской породы обладают более высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных погодных условий и, как следствие, имеют возможность воспроизводства потомства с более высоким иммунитетом. Таким образом, приведенный метод определения уровня гликогена в тканях органов пчел повышает точность диагностирования, играет в целом очень важную роль для определения уровня энергетического обмена насекомых и будет полезен для использования в области пчеловодства.

Ключевые слова: пчела, гликоген, ткани органов пчел, биохимические исследования, энергетический обмен.

UDC 638.124.2:591.11

DETERMINATION OF GLYCOGEN IN BEE ORGAN TISSUES AS AN ENERGY METABOLISM PARAMETER

I. V. Serduchenko¹, N. N. Gugushvili²

¹ Associate Professor, FGBEI HE "Kuban State Agrarian University n. a. I. T. Trubilin", Krasnodar, Russia, e-mail: serd-ira2013@yandex.ru

² Professor, Doctor of Science (Biology), FGBEI HE "Kuban State Agrarian University n. a. I. T. Trubilin", Krasnodar, Russia

SUMMARY

New method of glycogen determination in bee organ tissues, considerably different from the existing ones, was suggested. Ghoreishi's colorimetric method used today is time-, labor- and cost-consuming as the major reagent – orcin – is quite expensive. Comparison of cost-effectiveness of the two methods demonstrated that the proposed technique makes it possible to reduce expenses by using a more available and less expensive resorcin instead of orcin and reducing total test time from 4 to 3 hours 5 minutes. Glycogen contents determination using the updated method was performed in bees of four breeds: Italian-Carpathian, Carpathian, Oka, gray Caucasus mountain honeybees. It was determined that the Oka honeybees demonstrated the highest glycogen level. It is known that the higher is glycogen contents in organs and tissues the better is energy metabolism in insects. Consequently, honeybees of Oka breeds have higher resistance to unfavorable weather conditions and can produce progeny with a higher level of immunity. So, the specified method of glycogen determination in bee organ tissues increases the accuracy of diagnosis and plays a very important role in determining the level of energy metabolism in insects and will be useful for apiculture.

Key words: bee, glycogen, bee organ tissues, biochemical tests, energy metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

Гликоген – полисахарид, или животный крахмал, который синтезируется организмом и депонируется во всех его органах и тканях [3, 4]. Гликоген является легкоомобилизуемой резервной формой глюкозы и представляет собой разветвленный полимер из остатков глюкозы крови [2, 7].

Существует несколько способов определения гликогена в крови: ШИК-реакция (полисахариды выявляются в результате реакции, окисляющей спиртные группы, которые преобразуются в альдегидные группы, и отожествления последних путем цветной реакции реактивом Шиффа), метод Шабадаша (при котором периодат калия окисляет гликоген с образованием альдегидных соединений, легко реагирующих с реактивом Шиффа, в местах локализации гликогена выявляется вишнево-фиолетовое окрашивание), колориметрический метод с орцином по Хорейши (гликоген осаждают спиртом, гидролизуют в кислой среде до глюкозы и нагревают в серной кислоте, которая превращается в оксиметилфурфурол, конденсируясь с орцином и образуя окрашенное соединение) [2, 3, 7].

Недостатками данных методов являются: трудоемкий длительный процесс, не вполне точное определение содержания гликогена в крови, а также невозможность определения его уровня в тканях органов у пчел. Для повышения точности диагностирования, уменьшения временных и материальных затрат необходимо усовершенствование методики определения гликогена, применяемой в пчеловодстве.

Таким образом, разработка метода определения содержания гликогена в тканях органов пчел является одной из актуальных задач в пчеловодстве, так как гликоген является важным показателем энергетического

Таблица 1
Показатели экстинции

Группы пчел	Экстинция проб	
	E_{on}	$E_{ст}$
1-я группа (итало-карпатская порода)	0,438	0,256
2-я группа (карпатская порода)	0,584	0,251
3-я группа (приокская порода)	0,950	0,301
4-я группа (серая горная кавказская порода)	0,566	0,253

Рис. 1. Показатели экстинции проб

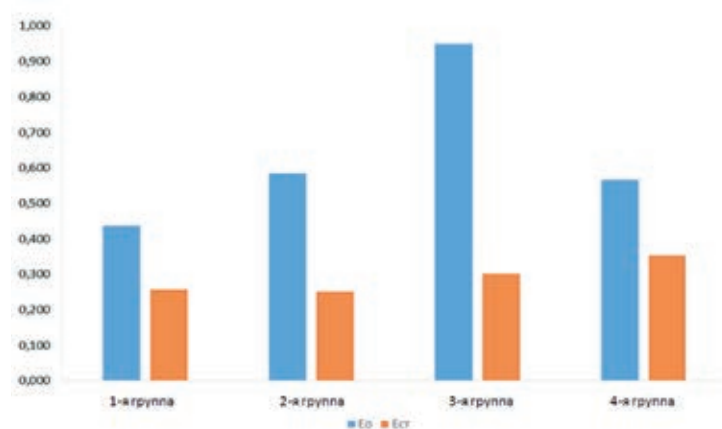
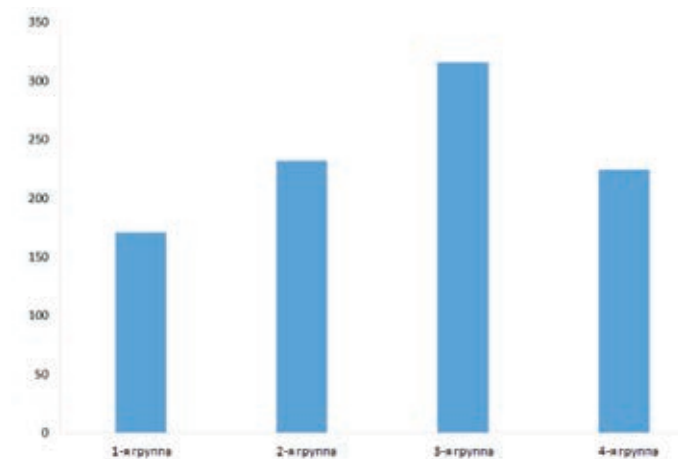


Таблица 2
Содержание гликогена в экстрактах из органов и тканей пчел

Группы пчел	Количество гликогена, мг%
1-я группа (итало-карпатская порода)	171,0
2-я группа (карпатская порода)	232,0
3-я группа (приокская порода)	316,0
4-я группа (серая горная кавказская порода)	224,0

Рис. 2. Содержание гликогена в пробах



ресурса организма насекомого [5, 6]. Целью исследования явилось определение уровня гликогена в тканях органов у пчел различных пород.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований было создано 4 группы из пчел разных пород (итало-карпатской, карпатской, приокской, серой горной кавказской) по 10 насекомых в каждой.

Исследование состояло из следующих этапов.

Подготовка экстракта из органов и тканей пчел.

С помощью пинцета и глазных ножниц у пчел удаляли наружный покров и кишечник. Ткани и органы, полученные от десяти пчел, растирали в фарфоровой ступке, добавляя физиологический раствор (1:1). Затем суспензию выдерживали в холодильнике при +5 °С в течение 1,0–1,5 ч и фильтровали через бумажный фильтр.

Приготовление растворов. Готовили 1%-й раствор резорцина на 52%-й серной кислоте; 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты, растворяя навеску 5 г в 99 мл дистиллированной воды. Для получения стандартного раствора 10 мг глюкозы растворяли в 300 мл дистиллированной воды.

Осаждение и гидролиз гликогена из экстракта органов и тканей пчел. 0,3 мл отфильтрованного экстракта из тканей пчел помещали в центрифужную пробирку, вносили 0,2 мл дистиллированной воды и 0,2 мл 30%-го раствора гидроксида натрия. Затем пробирку помещали в кипящую водяную баню на 1,5 ч, охлаждали, вносили 1 мл 96%-го этилового спирта, перемешивали, охлаждали на льду в течение 15 мин и центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 1 мл 96%-го этилового спирта, ресуспендировали, охлаждали на льду в течение 15 мин и вновь центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость осторожно убрали, осадок ресуспендировали в 3 мл дистиллированной воды, добавляли 13 мл 52%-го раствора серной кислоты, 2 мл 1%-го резорцина и перемешивали.

Определение содержания гликогена. В контрольную (чистую) пробирку и пробирку со стандартным раствором глюкозы добавляли по 3 мл дистиллированной воды и по 13 мл 52%-го раствора серной кислоты, перемешивали и вносили по 2 мл 1%-го раствора резорцина.

Все пробирки помещали в водяную баню на 20 мин при температуре 80 °С, затем охлаждали на льду в течение 15 мин. Пробирки, содержащие глюкозу, имели коричнево-желтое окрашивание.

Фотоколориметрирование проводили против контроля на КФК-3 при длине волны $\lambda = 315$ нм.

Расчет содержания гликогена в полученном экстракте проводили по формуле

$$\Gamma = \frac{E_{on}}{E_{ст}} \times 100,$$

где Γ – количество гликогена, мг%;

E_{on} – экстинция опытной пробы;

$E_{ст}$ – экстинция стандартного раствора.

Расчет экономической эффективности предложенного метода проводили по общепринятым формулам расчета затрат на проведение мероприятий, которые складываются из стоимости трудовых и материальных ресурсов, использованных на проведение исследований [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сводные данные по определению экстинции приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Во всех четырех группах пчел определяемый показатель заметно варьировал. Из полученных результатов исследований видно, что самым высоким он (как в опытной пробе, так и в стандартном растворе) был среди пчел приокской породы и составил 0,950 и 0,301 соответственно. Самый низкий уровень экстинции показали пчелы итапо-карпатской породы: 0,438 – в опытной пробе и 0,256 – в стандартной.

Содержание гликогена в полученных экстрактах рассчитывали по всем группам пчел. Сводные данные представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

Из приведенных данных видно, что разные породы пчел имеют неодинаковый уровень содержания гликогена и, следовательно, различные энергетические ресурсы. Это обусловлено, прежде всего, разными видами особенностями организма пчел.

Из всех четырех групп самые высокие показатели гликогена были определены у пчел 3-й группы – приокской породы. Следовательно, насекомые данной породы обладают наибольшими энергетическими ресурсами в сравнении с остальными, обладают повышенной устойчивостью к воздействию неблагоприятных погодных условий и имеют возможность воспроизводства потомства с повышенным уровнем иммунитета.

Также был проведен расчет экономической эффективности представленной методики в сравнении с наиболее часто применяемой методикой определения гликогена с орцином по Хорейши (табл. 3).

Приведенные в таблице 3 данные показывают, что высокая экономическая эффективность предлагаемой методики достигается за счет:

- уменьшения времени охлаждения после кипячения на водяной бане с 30 до 15 мин за счет быстрого охлаждения в морозильной камере;
- уменьшения количества центрифугирований;
- использования более доступного и недорогого резорцина вместо орцина;
- сокращения общего времени проведения исследования с 4 ч до 3 ч 5 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый способ является доступным, простым в исполнении, дает возможность быстрого определения содержания гликогена в тканях органов пчел в сравнении с известными методами определения содержания гликогена в крови животных.

Предложенный метод позволяет рассчитать содержание гликогена в экстракте из органов и тканей пчел и, как следствие, определить уровень энергетического обмена организма пчел разных пород с целью определения породы, наиболее устойчивой к воздействию различных неблагоприятных факторов, и породы, способной воспроизводить более сильное потомство.

Рассмотренная методика является более экономической в сравнении с существующими методиками определения гликогена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононов А. Н., Симонов А. Н. Экономика ветеринарных мероприятий: рабочая тетрадь для проведения лаб.-практ. занятий. – Ставрополь, 2012. – 36 с.

Таблица 3

Экономическая эффективность методики определения гликогена в тканях органов пчел

Показатели	Методика определения по Хорейши	Методика определения гликогена в тканях органов пчел
Количество проводимых центрифугирований при 3000 g в течение 15 мин	3	2
Основной используемый химический реактив	Орцин 1%	Резорцин 1%
Стоимость реактива за 1 кг, руб.	3960	723
Общее время проведения исследования	4 ч	3 ч 5 мин

2. Момот Ю. А. Содержание гликогена в железистом эпителии серозных желез // Ученые записки КГАВМ. – 2012. – Т. 210. – С. 133–136.

3. Пат. 1270704 СССР, МПК G01N 33/48. Способ определения гликогена в тканях животных / Ю. А. Колос, В. Я. Шаблий, В. П. Сапейко, В. Н. Глушенко; Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт. – 3780292/28-14; заявл. 15.08.84; опубл. 15.11.86.

4. Связывание гликогенфосфорилазы b и киназы фосфорилазы с гликогеном в условиях молекулярного краудинга. Ингибирующий эффект FAB / Н. А. Чеботарева, А. В. Меремьянин, В. Ф. Макеева [и др.] // Биохимия. – 2009. – Т. 74, вып. 5. – С. 691–698.

5. Сердюченко И. В., Тараненко Е. А. Взаимосвязь состояния кишечника пчел с их физиологической активностью // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: материалы 72-й науч.-практ. конф. преподавателей по итогам НИР за 2016 г. – Краснодар, 2017. – С. 191–192.

6. Статистический анализ комплекса признаков пчел серой горной кавказской породы / Л. Я. Морев, И. А. Морев, А. В. Абрамчук [и др.] // Труды Русского энтомологического общества. – Санкт-Петербург, 2013. – Т. 84, № 1. – С. 29–33.

7. Zea C. J., MacDonell S. W., Pohl N. L. Discovery of the archaeal chemical link between glycogen (starch) synthase families using a new mass spectrometry assay // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125, No. 45. – P. 13666–13667.

REFERENCES

1. Kononov A. N., Simonov A. N. Economy of Veterinary Measures: activity book for laboratory practicum [Ekonomika veterinarnykh meroprityatij: rabochaya tetrad' dlya provedeniya lab.-prakt. zanyatij]. Stavropol; 2012 (in Russian).

2. Momot Yu. A. Glycogen contents in glandular epithelium of serous glands [Soderzhanie glikogena v zhelezistom epiteli s seroznykh zhelez]. Uchenye zapiski KGAVM. 2012; 210: 133–136 (in Russian).

3. Pat. 1270704 USSR, MPK G01N 33/48. Method of glycogen determination in animal tissues [Sposob opredeleniya glikogena v tkanyah zhivotnykh]. Yu. A. Kolos, V. Ya. Shabliy, V. P. Sapeiko, V. N. Glushenko; Ukrainian Scientific and Research Veterinary Institute. 3780292/28-14; submitted on 15.08.84; published 15.11.86 (in Russian).

4. Chebotareva N. A., Meremyanin A. V., Makeyeva V. F. et al. Binding of glycogen phosphorylase b and phosphorylase kinase to glycogen under "molecular crowding" conditions. FAB inhibitory effect [Svyazyvanie glikogenfosforilazy b i kinazy fosforilazy s glikogenom v usloviyakh molekulyarnogo kraudinga. Ingibiruyushchij effekt FAB]. Biohimiya. 2009; 74 (5): 691–698 (in Russian).

5. Serduchenko I. V., Taranenko Ye. A. Influence of bee intestine condition on their physiological activity [Vzaimosvyaz' sostoyaniya kishchnika pchel s ik fiziologicheskoy aktivnost'yu]. Nauchnoe obespechenie agropromyshlennogo kompleksa: Materialy 72-j nauch.-prakt. konf. predavatelej po itogam NIR za 2016 g. Krasnodar; 2017: 191–192 (in Russian).

6. Moreva L. Ya., Morev I. A., Abramchuk A. V. et al. Statistic analysis of gray Caucasus mountain honeybee characteristics [Statisticheskij analiz kompleksa priznakov pchel seroj gornoj kavkazskoj porody]. Trudy Russkogo ehntomologicheskogo obshchestva. Saint-Petersburg; 2013; 84 (1): 29–33 (in Russian).

7. Zea C. J., MacDonell S. W., Pohl N. L. Discovery of the archaeal chemical link between glycogen (starch) synthase families using a new mass spectrometry assay. J. Am. Chem. Soc. 2003; 125(45): 13666–13667.

Поступила 16.02.18

Принята в печать 28.05.18

ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ УТОК ПЕКИНСКОЙ ПОРОДЫ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

Е. О. Анисимова¹, В. В. Пронин², Л. В. Клетикова³, Н. Н. Якименко⁴

¹Младший научный сотрудник, ООО «МБЦ «Генериум», г. Москва, Россия, e-mail: katerina.anisimova.91@mail.ru

²Руководитель центра доклинических исследований, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pronin@arriah.ru

³Профессор, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Ивановская ГСХА им. Д. К. Беляева», г. Иваново, Россия, e-mail: doktor_xxi@mail.ru

⁴Доцент, кандидат ветеринарных наук, ФГБОУ ВО «Ивановская ГСХА им. Д. К. Беляева», г. Иваново, Россия, e-mail: ninayakimenko@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены данные возрастной динамики гематологических и функциональных показателей крови уток пекинской породы на фоне применения селенорганического препарата ДАФС-25к (в дозе 1,3 мг/кг корма). Для изучения морфофункциональных показателей, начиная с суточного возраста и до 120 сут, у птиц каждые 15 сут отбирали кровь из подкрыльцовой вены утром, до кормления. Для оценки гематологических показателей производили подсчет эритроцитов и лейкоцитов, определяли содержание гемоглобина, показатель гематокрита, рассчитывали цветной показатель крови. В ходе эксперимента отмечено плавное увеличение данных показателей в опытной и контрольной группах. Показано, что у птиц опытной группы все показатели выше, чем у контрольной. Установлено достоверно значимое превышение содержания гемоглобина под влиянием селена в опытной группе в сравнении с контролем на 9,86%. Соответственно, у птиц этой группы был выше и цветной показатель крови ($p \leq 0,05$). Биохимический анализ крови включал в себя определение ряда показателей: общий белок, альбумин, мочевая кислота, глюкоза, кальций, фосфор, трансаминазы АЛТ и АСТ. Результаты исследования показали, что во все возрастные периоды содержание общего белка и альбумина у утят опытной группы превышает таковые показатели в контрольной группе. Селенсодержащий препарат оказал положительное влияние на углеводный обмен, обеспечивая высокий уровень обменных процессов у птиц, способствовал оптимизации кальций-фосфорного отношения, что благоприятно сказалось на минеральном обмене и формировании опорно-двигательного аппарата. Полученные показатели АСТ и АЛТ в обеих группах не выходят за рамки референсных значений, что косвенно подтверждает отсутствие токсического воздействия селена на организм уток в применяемых дозировках. Установлено, что ДАФС-25к не только не оказал отрицательного влияния на гематологические и биохимические показатели крови уток пекинской породы, но и способствовал коррекции минерального обмена, снижению воздействия стресс-факторов в критические периоды развития и нормализации функции выделительной системы.

Ключевые слова: утка пекинской породы, селенорганический препарат, гематологический анализ крови, биохимический анализ крови.

ВВЕДЕНИЕ

Птицеводство России вносит весомый вклад в обеспечение продовольственной безопасности как основной производитель высококачественного животного белка, доля которого в суточном рационе россиян достигает 40% за счет потребления яиц и мяса птицы [4, 12]. В структуре птицеводства выращивание утят на мясо – вторая по значению после бройлерной промышленности отрасль мясного птицеводства.

Молодняк уток мясных пород отличается высокой интенсивностью роста: за первые 7–8 недель жизни живая масса утят увеличивается в 50–60 раз, достигая к моменту убоя 3 кг и более, при затратах корма 3,2–3,4 кг на 1 кг привеса. Среди мясных пород наиболее распространенной является пекинская утка, высокие показатели мясной продуктивности которой позволяют разводить ее в промышленных масштабах [11].

Реализация резервов селекционно-генетического потенциала невозможна без высокого уровня ветеринарного обслуживания и современных технологий кормления, которые включают в себя использование различного рода добавок для профилактики нарушений обмена веществ и улучшения биоконверсии корма. Одной из таких добавок является селенорганический

препарат ДАФС-25к, который участвует в процессах тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, снижает скорость катализа отдельных ферментных систем, обладает антиоксидантными свойствами, а также препятствует перекислению жирных кислот и накоплению в организме ядовитых веществ, способствует повышению активности фермента глутатионпероксидазы, нормализуя обмен веществ [6]. В литературе имеются сведения об использовании селена в рационах животных и птиц [5, 8], однако сообщения, касающиеся его влияния на обмен веществ у птиц, фрагментарны, а по пекинской утке – отсутствуют.

Таким образом, целью работы было установление влияния селенорганического препарата ДАФС-25к на морфологические и биохимические показатели крови уток пекинской породы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В опыте использовали уток пекинской породы суточного возраста, полученных в КФХ «Ромашино» (Московская обл.), благополучном по инфекционным и инвазионным заболеваниям. Птицу выращивали в ЛПХ «Анисимов» (Владимирская обл.).

DYNAMICS OF HAEMATOLOGICAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF PEKIN DUCK BLOOD DURING ADMINISTRATION OF ORGANIC SELENIUM PREPARATION

Ye. O. Anisimova¹, V. V. Pronin², L. V. Kletikova³, N. N. Yakimenko⁴

¹ Junior Researcher, OOO "International Biotechnological Centre "Generium", Moscow, Russia, e-mail: katerina.anisimova.91@mail.ru

² Head of the Centre for Preclinical Tests, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: pronin@arriah.ru

³ Professor, Doctor of Science (Biology), FGBEI HE "Ivanovo State Academy of Agriculture n. a. D. K. Belyaev", Ivanovo, Russia, e-mail: doktor_xxi@mail.ru

⁴ Assistant Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBEI HE "Ivanovo State Academy of Agriculture n. a. D. K. Belyaev", Ivanovo, Russia, e-mail: ninayakimenko@rambler.ru

SUMMARY

Age-related dynamics of hematological and functional parameters of Pekin duck blood during administration of organic selenium preparation DAFS-25k (at a 1.3 mg/kg dose) was presented. In order to study morphological parameters from the age of one day old to 120 days old blood was collected from axillary vein of birds prior to feeding each 15 days in the morning. To assess hematological parameters RBC and WBC count was performed, hemoglobin contents and hematocrit value were determined and color index of blood was calculated. The experiment demonstrated gradual increase in these parameters in the experimental and control groups. Birds from the experimental group demonstrated higher parameters than those of the control group. It was determined that hemoglobin contents was 9.86% higher in the experimental group in comparison with the control group due to selenium administration. The blood color index in this group was also higher ($p \leq 0.05$). Biochemical blood analysis included the following parameters: total protein, albumin, uric acid, glucose, calcium, phosphorus, ALT and AST transaminase. The test results showed that during all age periods total protein and albumin contents in ducks of the experimental group exceeded those of the control group. The selenium-containing preparation had a positive influence on the carbohydrate metabolism ensuring high level of metabolic processes in birds, contributed to optimal calcium to phosphorus ratio which positively influenced mineral metabolism and development of the locomotor system. Obtained AST and ALT values in both groups are not beyond reference values which indirectly confirms absence of toxic effect on ducks' organism if selenium is administered at the specified doses. It was determined that DAFS-25k has not affected hematological and functional parameters of Pekin duck blood and it contributed to mineral metabolism correction, reduction of stress factor effect within critical periods of development and improvement of the excretory system function.

Key words: Pekin duck, organic selenium preparation, hematology test, biochemical blood analysis.

Условия содержания и кормления уток соответствовали требованиям и нормам, представленным в Методических рекомендациях по технологическому проектированию птицеводческих предприятий РД-АПК 1.10.05.04-13. Для определения содержания в комбикорме селена провели анализ на атомно-адсорбционной спектрометре МГА-915МД в Костромской областной ветеринарной лаборатории.

Для проведения эксперимента были сформированы опытная и контрольная группы по 40 птиц в каждой. До начала опыта провели убой пяти утят суточного возраста для определения показателей крови. Птицы контрольной группы получали основной рацион, принятый в хозяйстве. Утятам опытной группы ежедневно в рацион добавляли селенсодержащий препарат ДАФС-25к в дозе 1,3 мг/кг корма. Для изучения морфофункциональных показателей у птиц каждые 15 сут отбирали кровь из подкрыльцовой вены утром, до кормления. Срок эксперимента составил 120 сут.

Подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов в крови проводили по методу К. С. Фоминой и В. И. Шмельковой в камере Горяева; содержания гемоглобина – методом Сали; гематокритную величину –

с помощью гематокритной центрифуги СМ-70. Цветной показатель (ЦП) определяли по формуле

$$\text{ЦП} = \frac{\text{гемоглобин, г/л}}{\text{первые 3 цифры числа эритроцитов}} \times 3.$$

Биохимический анализ крови включал в себя определение ряда показателей: общий белок, альбумин, мочевиная кислота, глюкоза, кальций, фосфор, трансаминазы АЛТ и АСТ. Исследование проводили с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Biochem BA открытого типа с использованием реактивов фирмы «Ольвекс».

Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики на персональном компьютере с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты гематологических исследований крови уток пекинской породы показали, что в суточном возрасте содержание эритроцитов составляет $(3,51 \pm 0,11) \times 10^{12}/\text{л}$, гемоглобина – $(110,14 \pm 1,61) \text{ г/л}$, лейкоцитов – $(12,84 \pm 0,12) \times 10^9/\text{л}$, что соответствует референсным показателям для этого вида птиц (табл. 1) [2].

Таблица 1

Возрастная динамика морфологических показателей крови уток пекинской породы контрольной и опытной групп

n = 5

Возраст птицы, сут	Гематокрит, %		Эритроциты, $\times 10^{12}/л$		Гемоглобин, г/л		Цветной показатель		Лейкоциты, $\times 10^9/л$	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
1	39,88 $\pm$ 0,22		3,51 $\pm$ 0,11		110,14 $\pm$ 1,61		1,53 $\pm$ 0,06		12,84 $\pm$ 0,12	
15	41,50 $\pm$ 0,27	41,62 $\pm$ 0,23	3,62 $\pm$ 0,15	3,68 $\pm$ 0,08	115,63 $\pm$ 2,32	117,30 $\pm$ 2,16	0,95 $\pm$ 0,07	0,95 $\pm$ 0,05	13,62 $\pm$ 0,17	13,32 $\pm$ 0,81
30	41,00 $\pm$ 0,27	41,30 $\pm$ 0,13	3,68 $\pm$ 0,12	3,74 $\pm$ 0,05	115,18 $\pm$ 3,46	119,86 $\pm$ 2,37	0,95 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,03	14,08 $\pm$ 0,11	14,12 $\pm$ 0,21
45	41,36 $\pm$ 0,16	42,64 $\pm$ 0,13	3,70 $\pm$ 0,11	3,85 $\pm$ 0,06	116,01 $\pm$ 2,34	121,04 $\pm$ 2,18	0,94 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,03	13,89 $\pm$ 0,14	14,04 $\pm$ 0,16
60	41,84 $\pm$ 0,17	43,18 $\pm$ 0,15	3,62 $\pm$ 0,08	3,71 $\pm$ 0,07	116,21 $\pm$ 2,16	123,48 $\pm$ 3,14	0,98 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,05	12,84 $\pm$ 0,45	13,67 $\pm$ 0,32
75	42,44 $\pm$ 0,18	42,86 $\pm$ 0,11	3,81 $\pm$ 0,06	3,82 $\pm$ 0,06	116,74 $\pm$ 2,26	126,38 $\pm$ 2,16*	0,92 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,02*	12,99 $\pm$ 0,10	13,09 $\pm$ 0,18
90	42,68 $\pm$ 0,18	43,01 $\pm$ 0,18	3,84 $\pm$ 0,06	3,88 $\pm$ 0,07	116,62 $\pm$ 1,16	127,20 $\pm$ 3,37*	0,92 $\pm$ 0,01	0,98 $\pm$ 0,01*	12,64 $\pm$ 0,15	13,39 $\pm$ 0,22
105	42,94 $\pm$ 0,19	43,79 $\pm$ 0,10	3,79 $\pm$ 0,08	3,82 $\pm$ 0,06	116,14 $\pm$ 2,18	127,85 $\pm$ 1,13*	0,93 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,01*	12,74 $\pm$ 0,11	12,84 $\pm$ 0,18
120	42,74 $\pm$ 0,17	43,81 $\pm$ 0,13	3,85 $\pm$ 0,09	3,95 $\pm$ 0,09	117,21 $\pm$ 1,22	127,98 $\pm$ 2,18*	0,93 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,02*	12,65 $\pm$ 0,10	12,93 $\pm$ 0,16

* $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

До 60-суточного возраста отмечено плавное увеличение показателей в обеих группах, однако замечено, что в опытной группе все показатели выше, чем в контрольной. Снижение количества эритроцитов в 60-суточном возрасте в обеих группах связано с критическим этапом развития, обусловленным началом ювенильной линьки. У птиц опытной группы это снижение было менее выраженным, что можно связать с положительным влиянием селена на гемопоэз. С 75- до 120-суточного возраста установлено достоверно значимое превышение содержания гемоглобина в опытной группе в сравнении с контролем на 9,86%. Соответственно, у птиц этой группы был выше и цветной показатель крови ($p \leq 0,05$). Содержание эритроцитов в течение всего эксперимента (120 сут) в контрольной и опытной группах нелинейно

увеличивалось от 3,51 $\times 10^{12}/л$ до 3,85 и 3,95 $\times 10^{12}/л$, т. е. от 9,11 до 11,56%.

Селенорганический препарат ДАФС-25к не оказал отрицательного воздействия на иммунобиологический статус: содержание лейкоцитов у утят опытной группы находилось в пределах (12,84–14,12) $\times 10^9/л$ и не имело достоверных различий с контрольной группой. Полученные данные о динамике гематологических показателей крови после коррекции рациона селеном согласуются с исследованиями других авторов [9–11].

Результаты биохимического анализа крови показали, что во все возрастные периоды содержание общего белка и альбумина у утят опытной группы превышает таковые показатели в контрольной группе, причем

Таблица 2

Динамика белка, мочевой кислоты, глюкозы в сыворотке крови уток пекинской породы контрольной и опытной групп

n = 5

Возраст птицы, сут	Общий белок, г/л		Альбумин, г/л		Мочевая кислота, мкмоль/л		Глюкоза, ммоль/л	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
1	37,18 $\pm$ 0,32		18,52 $\pm$ 0,21		486,22 $\pm$ 24,03		5,32 $\pm$ 0,11	
15	39,62 $\pm$ 0,34	40,12 $\pm$ 0,41	20,42 $\pm$ 0,17	21,96 $\pm$ 0,20	392,15 $\pm$ 18,06	382,42 $\pm$ 14,06	8,32 $\pm$ 0,11	8,64 $\pm$ 0,12
30	37,96 $\pm$ 0,33	43,60 $\pm$ 0,12*	20,41 $\pm$ 0,19	23,65 $\pm$ 0,18*	380,34 $\pm$ 14,15	370,36 $\pm$ 11,15	9,28 $\pm$ 0,12	9,80 $\pm$ 0,22
45	39,85 $\pm$ 0,38	44,68 $\pm$ 0,34*	23,37 $\pm$ 0,28	25,81 $\pm$ 0,23*	372,31 $\pm$ 12,11	365,28 $\pm$ 10,05	9,36 $\pm$ 0,11	10,91 $\pm$ 0,11*
60	41,65 $\pm$ 0,28	45,28 $\pm$ 0,28*	23,19 $\pm$ 0,19	25,90 $\pm$ 0,25*	391,44 $\pm$ 15,04	358,36 $\pm$ 12,14	9,28 $\pm$ 0,14	10,81 $\pm$ 0,16*
75	38,18 $\pm$ 0,34	44,02 $\pm$ 0,18*	21,36 $\pm$ 0,35	24,42 $\pm$ 0,18*	378,44 $\pm$ 10,27	342,41 $\pm$ 10,26	9,26 $\pm$ 0,12	10,79 $\pm$ 0,18*
90	40,51 $\pm$ 0,24	45,15 $\pm$ 0,37*	21,82 $\pm$ 0,19	23,71 $\pm$ 0,33*	362,54 $\pm$ 16,06	340,49 $\pm$ 12,08	9,32 $\pm$ 0,17	10,89 $\pm$ 0,17*
105	41,89 $\pm$ 0,31	44,08 $\pm$ 0,39*	23,14 $\pm$ 0,31	25,18 $\pm$ 0,29*	350,56 $\pm$ 14,05	333,19 $\pm$ 12,26	9,69 $\pm$ 0,18	10,90 $\pm$ 0,16*
120	41,10 $\pm$ 0,25	45,67 $\pm$ 0,30*	23,42 $\pm$ 0,26	25,10 $\pm$ 0,27	354,51 $\pm$ 10,11	338,57 $\pm$ 10,04	9,82 $\pm$ 0,14	10,93 $\pm$ 0,13*

* $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

Таблица 3

Динамика кальция и фосфора в сыворотке крови уток пекинской породы контрольной и опытной групп

n = 5

Возраст птицы, сут	Кальций, ммоль/л		Фосфор, ммоль/л		Соотношение кальция и фосфора, %	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
1	2,87 ± 0,07		1,39 ± 0,07		2,06 ± 0,07	
15	3,08 ± 0,09	3,16 ± 0,10	1,45 ± 0,08	1,49 ± 0,08	2,12 ± 0,11	2,12 ± 0,09
30	3,19 ± 0,09	3,42 ± 0,10*	1,49 ± 0,07	1,58 ± 0,09	2,13 ± 0,11	2,15 ± 0,08
45	3,18 ± 0,07	3,45 ± 0,07*	1,49 ± 0,06	1,61 ± 0,08*	2,14 ± 0,07	2,14 ± 0,11
60	3,20 ± 0,10	3,45 ± 0,08*	1,49 ± 0,04	1,57 ± 0,09*	2,15 ± 0,07	2,20 ± 0,07
75	3,22 ± 0,08	3,72 ± 0,09*	1,51 ± 0,05	1,67 ± 0,09*	2,13 ± 0,12	2,22 ± 0,09
90	3,75 ± 0,09	4,22 ± 0,10*	1,75 ± 0,11	1,93 ± 0,12*	2,14 ± 0,11	2,18 ± 0,10
105	3,45 ± 0,09	3,88 ± 0,09*	1,60 ± 0,09	1,80 ± 0,08*	2,16 ± 0,13	2,15 ± 0,11
120	3,30 ± 0,08	3,73 ± 0,09*	1,51 ± 0,07	1,70 ± 0,08*	2,18 ± 0,14	2,20 ± 0,09

* $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

с 30-суточного возраста эта разница достоверна ($p \leq 0,05$) и составляет от 9,81 до 11,40%. Следует отметить, что в 30- и 75-суточном возрасте интенсивность синтеза белка снижается в обеих группах в связи с критическим периодом в развитии утят, обусловленным сменой ювильного пуха на первичное перо и разгаром ювильной линьки. В контрольной группе снижение синтеза белка в эти периоды выражено значительнее. Селенорганический препарат способствовал коррекции белковосинтетической функции клеток у подопытных утят. Сходные данные были получены в своих работах и другими исследователями [7, 8, 13].

ДАФС-25к оказал положительное влияние и на углеводный обмен. У утят опытной группы содержание глюкозы в крови было выше во все исследуемые возрастные периоды, однако только с 30-суточного возраста эта разница стала достоверно значима и к 120-м сут составила 11,3% ($p \leq 0,05$, табл. 2). Это связано с более высоким уровнем обеспечения обменных процессов в этой группе.

Мочевая кислота – малорастворимое в воде соединение, которое синтезируется в печени и выводится почками как основной продукт метаболизма нуклеиновых кислот, основанной на протеиноме. В опытной группе отмечена устойчивая динамика снижения мочевой кислоты в сыворотке крови, что свидетельствует о более высокой функциональной активности мочевыделительной системы и согласуется с данными других авторов [1, 3].

Анализ динамики кальция и фосфора убедительно показал их более высокое содержание, не выходящее за границы референсных значений, в сыворотке крови уток пекинской породы опытной группы (табл. 3). ДАФС-25к способствовал оптимизации кальций-фосфорного отношения, что благоприятно сказалось на минеральном обмене и формировании опорно-двигательного аппарата.

Ферменты аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ) катализируют важнейшие процессы, связанные с белковым обменом, участвуют

в переаминировании аминокислот и их синтезе. У подопытных утят с 45-суточного возраста отмечена более высокая активность АЛТ. Анализ динамики АСТ свидетельствует о тенденции повышения этого показателя в опытной группе (табл. 4). Показатели АСТ и АЛТ в обеих группах не выходят за рамки референсных значений, что косвенно подтверждает отсутствие токсического воздействия селена на организм уток в применяемых дозировках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что под влиянием селенорганического препарата ДАФС-25к содержание гемоглобина в крови уток опытной группы в сравнении с контрольной было выше на 9,86%, что способствует более интенсивному насыщению тканей кислородом и активизации окислительно-восстановительных реакций. ДАФС-25к оказал положительное влияние на белковый обмен, под его влиянием содержание общего белка в сыворотке крови у подопытных уток было больше на 9,81%, а альбумина – на 11,40% в сравнении с контролем, что свидетельствует об активизации белковосинтетической функции клеток. Содержание глюкозы в крови птицы опытной группы превышало аналогичный показатель контроля на 11,3%, это обеспечивает более высокое энергетическое обеспечение метаболизма. В применяемой дозировке кормовая добавка способствует коррекции минерального обмена, стимулирует активность выделительной системы, о чем свидетельствует более низкое содержание мочевой кислоты в крови подопытных уток, а анализ динамики АЛТ и АСТ подтверждает отсутствие токсического эффекта от ее применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Имангулов Ш. А., Папазян Т. Т., Кавтарашвили А. Ш. Мочекислый диатез, подагра, мочекаменная болезнь птицы: меры профилактики и снижения ущерба. – Сергиев Посад, 2001. – 51 с.
- Клинические и биохимические показатели крови птиц / В. А. Пономарев, В. В. Пронин, Л. В. Клетикова [и др.]. – Иваново: ПресСто, 2014. – 288 с.

Таблица 4
Динамика энзиматической активности аминотрансфераз в сыворотке крови уток пекинской породы контрольной и опытной групп
n = 5

Возраст птицы, сут	АЛТ, Ед/л		АСТ, Ед/л	
	контроль	опыт	контроль	опыт
1	20,40 ± 0,23		77,97 ± 0,48	
15	16,74 ± 0,16	17,11 ± 0,20	63,12 ± 0,38	64,21 ± 0,28
30	18,21 ± 0,18	19,34 ± 0,18	66,80 ± 0,32	68,51 ± 0,36
45	19,18 ± 0,14	20,11 ± 0,12*	67,14 ± 0,43	69,30 ± 0,38
60	23,67 ± 0,28	26,08 ± 0,18*	63,45 ± 0,52	64,48 ± 0,44
75	23,45 ± 0,16	26,54 ± 0,16*	67,11 ± 0,48	67,21 ± 0,42
90	23,48 ± 0,33	28,14 ± 0,34*	68,40 ± 0,31	69,12 ± 0,38
105	24,68 ± 0,22	28,62 ± 0,18*	70,45 ± 0,23	72,06 ± 0,58
120	24,88 ± 0,28	29,14 ± 0,18*	70,78 ± 0,60	72,12 ± 0,42

* $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

- Малюкин А. В. Динамика морфологических и функциональных показателей почек и крови уток в постнатальном онтогенезе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2010. – 19 с.
- Нечаев В. И., Фетисов С. Д., Мисюра Н. А. Программно-целевой подход в развитии промышленного птицеводства // АПК: экономика, управление. – 2010. – № 4. – С. 41–48.
- Пронин В. В., Фисенко С. П., Пронин А. В. Характеристика морфологических и биохимических показателей крови телят черно-пестрой породы под влиянием йода и селена // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. – 2010. – Т. 201. – С. 316–319.
- Селеноорганические препараты ДАФС-25 и Селенолин в животноводстве / Б. Л. Чугай, А. С. Краснослободцева, М. П. Крысин, А. И. Фролов // Вестник ТГУ. – 2009. – Т. 14, № 1. – С. 156–157.
- Сквородин Е. Н., Давлетова В. Д., Дюдьбин О. В. Влияние препаратов Солвими Селен и Селемаг на рост и развитие мускусных уток // Ветеринария. – 2013. – № 9. – С. 16–20.
- Суханова С. Ф., Твердохлебов А. А. Селеновые препараты в рационе гусей // Птицеводство. – 2004. – № 10. – С. 9–10.
- Тарабанова Е. В. Физиологический статус сельскохозяйственной птицы в раннем онтогенезе при выращивании с использованием серебряного нанобиокмполита: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2013. – 29 с.
- Топурия Г. М., Топурия Л. Ю., Корелин В. П. Биохимические показатели крови утят при применении хитозана // Известия Оренбургского ГАУ. – 2013. – № 5 (43). – С. 110–113.
- Фермерское и приусадебное птицеводство / Б. Ф. Бессарабов, И. И. Кочиш, А. Л. Киселев [и др.]. – М.: ЗооВетКнига, 2015. – 265 с.
- Фисинин В. И. Птицеводство России в 2011 году: состояние и перспективы инновационного развития до 2020 года // Инновационные разработки и их освоение в промышленном птицеводстве: материалы XVII Междунар. конф. ВНАП. – Сергиев Посад, 2012. – С. 7–17.

13. Шишкина Д. А. Морфология печени гусей китайской серой породы на фоне применения селеноорганического препарата ДАФС-25к: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М., 2016. – 19 с.

REFERENCES

- Imangulov Sh. A., Papazyan T. T., Kavtarashvili A. Sh. Uratic diathesis, gout, kidney stone disease of birds: measures for prevention and reduction of losses [Mocheikislyj diatez, podagra, mochekamennaya bolezn' pticy: mery profilaktiki i snizheniya ushcherba]. Sergiev Posad; 2001 (in Russian).
- Ponomarev V. A., Pronin V. V., Kletikova L. V. et al. Clinical and biochemical parameters of bird blood [Klinicheskie i biohimicheskie pokazateli krovi ptic]. Ivanovo: PresSto; 2014 (in Russian).
- Malukin A. V. Dynamics of morphological and functional parameters of duck kidneys and blood in postnatal ontogenesis: abstract of a thesis. Candidate of Science (Biology) [Dinamika morfologicheskikh i funktsional'nykh pokazatelej pochek i krovi utok v postnatal'nom ontogeneze: avtoref. dis. kand. biol. nauk]. Stavropol; 2010 (in Russian).
- Nechayev V. I., Fetisov S. D., Misyura N. A. Program-oriented approach to commercial poultry farming development [Programmno-celevoy podhod v razvitii promyshlennogo pticevodstva]. APK: jehkonomika, upravlenie. 2010; 4: 4148 (in Russian).
- Pronin V. V., Fisenko S. P., Pronin A. V. Characteristics of morphological and biochemical parameters of Holstein calves influenced by iodine and selenium [Harakteristika morfologicheskikh i biohimicheskikh pokazatelej krovi telyat cherno-pestroj porody pod vliyaniem joda i selen]. Uchenye zapiski KGAVM im. N. E. Bauman. 2010; 201: 316–319 (in Russian).
- Chugai B. L., Krasnoslobodtseva A. S., Krysin M. P., Frolov A. I. Organic selenium preparations DAFS-25 and Selenolin in animal production [Sele-noorganicheskie preparaty DAFS-25 i Selenolin v zhivotnovodstve]. Vestnik TGU. 2009; 14 (1): 156–157 (in Russian).
- Skovorodin Ye. N., Davletova V. D., Dyudbin O. V. Solvimin Selenium and Selemag influence on duck growth and development [Vliyanie preparatov Solvimin Selen i Selemag na rost i razvitie utok]. Veterinariya. 2013; 9: 1620 (in Russian).
- Sukhanova S. F., Tverдохлебов A. A. Selenium-based preparations in geese diet [Selenovye preparaty v racione gusej]. Pticevodstvo. 2004; 10: 910 (in Russian).
- Tarabanova Ye. V. Physiological status of poultry in early ontogenesis when reared using silver nano-bio-composites: Abstract of the thesis. Candidate of Science (Biology). [Fiziologicheskij status sel'skokozyajstvennoj pticy v rannem ontogeneze pri vyrashchivani s ispol'zovaniem serebrjanogo nanobiokompozita: avtoref. dis. kand. biol. nauk]. Novosibirsk; 2013 (in Russian).
- Topuria G. M., Topuria L. Yu., Korelin V. P. Biochemical criteria of duck blood at chitosan administration [Biohimicheskie pokazateli krovi utyat pri primenenii hitozana]. Izvestiya Orenburgskogo GAU. 2013; 5 (43): 110–113 (in Russian).
- Bessarabov B. F., Kochish I. I., Kiselev A. L. et al. Commercial and backyard poultry farming [Fermerskoe i priusadebnoe pticevodstvo]. M.: ZooVetKniga; 2015 (in Russian).
- Fisinin V. I. Poultry farming in Russia in 2011: condition and prospects of innovation development until 2020 [Pticevodstvo Rossii v 2011 godu: sostoyaniye i perspektivy innovatsionnogo razvitiya do 2020 goda]. Innovatsionnye razrabotki i ih osvoenie v promyshlennom pticevodstve: Materialy XVII Mezhdunar. konf. VNAP. Sergiev Posad; 2012: 7–17 (in Russian).
- Shishkina D. A. Morphology of the grey Chinese geese liver during administration of organic selenium preparation DAFS-25k: Abstract of the thesis. Candidate of Science (Veterinary Medicine) [Morfologiya pecheni gusej kitajskoj seroj porody na fone primeneniya selenoorganicheskogo preparata DAFS-25k: avtoref. dis. kand. vet. nauk]. M.; 2016 (in Russian).

Поступила 19.04.18
 Принята в печать 21.05.18

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

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

- Редакция «Ветеринарии сегодня» (<http://veterinary.arriah.ru/jour/index>) 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, e-mail: lavruhina@arriah.ru

«Ветеринария сегодня» – это прекрасная возможность заявить о себе миру!



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

ФГБУ «ВНИИЗЖ» образовано в 1958 г. как Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт (ВНИЯИ). Сегодня учреждение является уникальным, признанным во всем мире центром по решению проблем здоровья животных и птиц.

ОСНОВНЫМИ НАПРАВЛЕНИЯМИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРА В ОБЛАСТИ БОРЬБЫ С БОЛЕЗНЯМИ СВИНЕЙ ЯВЛЯЮТСЯ:

разработка и внедрение в ветеринарную практику высокоэффективных лечебно-профилактических и диагностических препаратов против болезней свиней.

ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ПРОИЗВОДИТ ВАКЦИНЫ:

- против инфекционных болезней свиней: пастереллеза, сальмонеллеза, гемофилезного полисерозита свиней, актинобациллезной плевропневмонии свиней, репродуктивно-респираторного синдрома, парвовирусной инфекции, болезни Ауески и трансмиссивного гастроэнтерита свиней;
- против ящура всех типов.

ПРОВОДИТ ДИАГНОСТИКУ:

- диагностические исследования на ящур всех типов;
- диагностические исследования на наличие вируса АЧС и КЧС;
- выделение вируса болезни Ауески в культуре клеток;
- обнаружение респираторных болезней свиней;
- исследования на наличие коронавирусов свиней;
- мониторинговые и скрининговые исследования инфекционных болезней свиней;

- дифференциальная диагностика желудочно-кишечных болезней;
- дифференциальная диагностика болезней свиней, протекающих с поражением центральной нервной системы.

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

Важным аспектом деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» является оказание научно-методической и практической помощи ветеринарным специалистам лабораторий и животноводческих предприятий, разработка мероприятий для профилактики и ликвидации инфекционных болезней свиней. Ученые Центра ведут научное сопровождение продукции ФГБУ «ВНИИЗЖ» и непрерывную консультативную деятельность в хозяйствах. Учреждение осуществляет подготовку научных кадров – аспирантов и соискателей, обучение специалистов, стажеров и практикантов, а также проводит курсы повышения квалификации по вопросам диагностики, профилактики и мерам борьбы с инфекционными болезнями животных.

**По вопросам приобретения
ветеринарных препаратов
производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»
обращаться по телефонам
8 (4922) 26-15-12, (4922) 26-15-25**