



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



НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ИФА
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К НЕСТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ
ВИРУСА ЯЩУРА В СЫВОРОТКАХ
КРОВИ СВИНЕЙ
с. 13

INDIRECT ELISA FOR DETECTION
OF ANTIBODIES
TO FMDV NON-STRUCTURAL
PROTEINS IN PORCINE SERA
p. 17

РАЗРАБОТКА И ОСНОВНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕПРЯМОГО
ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К ВИРУСУ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ
ДИАРЕИ СВИНЕЙ
с. 8

DEVELOPMENT AND BASIC FEATURES
OF INDIRECT ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY FOR
DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST
PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA
p. 8

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР,
ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ
СТРАН СНГ В 2015–2017 ГГ.
с. 30

GENETIC CHARACTERIZATION
OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS
VIRUS ISOLATES RECOVERED
IN CIS COUNTRIES IN 2015–2017
p. 35

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 Lavruhina, 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 ИЭВ им. С. Н. Вышелеского, 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

Никитин И. Н. – доктор ветеринарных наук, ФГБОУ «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», Казань

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. Vyshel'sky, 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

Nikitin I. N. – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan

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 № ФС 77-49033 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 FS 77-49033, 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 РАН, 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 научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

Mischenko V. A. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, 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 ВНИИТБП, г. Щелково

Samuylenko A. Ya. — Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGБНУ VNIITBP, 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, FGБНУ 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 VNIIIPAT 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 сентября 2018 года
Дата выхода 28.09.2018

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

Approved for print 26 september 2018
Issued: 28.09.2018

СОДЕРЖАНИЕ

БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

3 Али Мазлум, И. Ю. Жуков, А. С. Першин, А. С. Иголкин, Н. Н. Власова
ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА р30 НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ *IN VITRO*

8 А. В. Каньшина, А. С. Яковлева, Е. С. Орлова, А. В. Щербаков
РАЗРАБОТКА И ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
К ВИРУСУ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ ДИАРЕИ СВИНЕЙ

13 А. С. Яковлева, А. В. Каньшина, А. В. Щербаков
НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К НЕСТРУКТУРНЫМ
БЕЛКАМ ВИРУСА ЯЩУРА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

21 Д. Н. Федосеева, Е. В. Аронова, А. А. Варенцова, А. А. Елсукова,
Али Мазлум, Д. В. Шарыпова, Н. Н. Власова, А. С. Иголкин
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ДНК ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ,
ПРОВЕДЕННЫХ В 2017 Г.

26 В. С. Русалеев
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ АКТИНОБАЦИЛЛЕЗНОЙ
ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ РЕШЕНИЯ

БОЛЕЗНИ ПТИЦ

30 Л. О. Щербакова, С. Н. Колосов, З. Б. Никонова, Н. Г. Зиняков,
Е. В. Овчинникова, И. А. Чвала
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ
СТРАН СНГ В 2015–2017 ГГ.

40 В. В. Пронин, Е. О. Анисимова, М. С. Дюмин, С. П. Фисенко
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТИМУСА УТОК ПЕКИНСКОЙ
ПОРОДЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКОЙ
ДОБАВКИ ДАФС-25к

46 В. Ю. Сосипаторова, Д. А. Алтунин, И. А. Чвала, Н. С. Мудрак, Д. Б. Андрейчук
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ИНДЕЕК
ВИРУСОМ ГРИППА A/DUCK/ALTAI/469/14 H5N1

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

52 О. А. Рябикина, В. И. Диев, О. П. Бьядовская, А. В. Константинов,
С. К. Старов, А. В. Кононов, В. Ю. Кулаков, О. Н. Петрова
ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ НЕПРЯМОГО «СЭНДВИЧ»-ВАРИАНТА
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА
ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО (НОДУЛЯРНОГО) ДЕРМАТИТА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

58 В. А. Калашникова, А. В. Демерчян
АНАЛИЗ СМЕРТНОСТИ ОТ ПНЕВМОНИИ ОБЕЗЬЯН, СОДЕРЖАЩИХСЯ
В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ, И МЕСТО МЕТИЦИЛЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНОГО
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) В СПЕКТРЕ ВЫДЕЛЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

63 Г. С. Скитович, Н. Б. Шадрова, О. В. Прунтова, К. В. Серова
ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА
LISTERIA MONOCYTOGENES

69 Е. Г. Кокорина, Э. И. Элизбарашвили
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА
ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КОШЕК НА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

CONTENTS

PORCINE DISEASES

3 Ali Mazloun, I. Yu. Zhukov, A. S. Pershin, A. S. Igolkin, N. N. Vlasova
EFFECT OF p30 RECOMBINANT PROTEIN ON AFRICAN SWINE FEVER VIRUS
IN VITRO REPRODUCTION

8 A. V. Kanshina, A. S. Yakovleva, Ye. S. Orlova, A. V. Scherbakov
DEVELOPMENT AND BASIC FEATURES OF INDIRECT ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST
PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA

17 A. S. Yakovleva, A. V. Kanshina, A. V. Scherbakov
INDIRECT ELISA FOR DETECTION OF ANTIBODIES
TO FMDV NON-STRUCTURAL PROTEINS IN PORCINE SERA

21 D. N. Fedoseyeva, Ye. V. Aronova, A. A. Varentsova, A. A. Yelsukova,
Ali Mazloun, D. V. Sharypova, N. N. Vlasova, A. S. Igolkin
ANALYSIS OF MONITORING STUDIES ON AFRICAN SWINE FEVER VIRUS
DNA DETECTION CARRIED OUT IN 2017

26 V. S. Rusaleyev
ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE
IN SWINE: PROBLEMS AND SOLUTIONS

AVIAN DISEASES

35 L. O. Scherbakova, S. N. Kolosov, Z. B. Nikonova, N. G. Zinyakov,
Ye. V. Ovchinnikova, I. A. Chvala
GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS
ISOLATES RECOVERED IN CIS COUNTRIES IN 2015–2017

40 V. V. Pronin, Ye. O. Anisimova, M. S. Dyumin, S. P. Fisenko
MORPHOFUNCTIONAL EVALUATION OF THYMUS IN PEKIN DUCK
DURING DIETARY INCORPORATION OF ORGANIC SELENIUM
FEED ADDITIVE DAFS-25k

46 V. Yu. Sosipatorova, D. A. Altunin, I. A. Chvala, N. S. Mudrak, D. B. Andreychuk
RESULTS OF EXPERIMENTAL INFECTION OF TURKEYS
WITH A/DUCK/ALTAI/469/14 H5N1 STRAIN OF AVIAN INFLUENZA VIRUS

CATTLE DISEASES

52 O. A. Ryabikina, V. I. Diev, O. P. Byadovskaya, A. V. Konstantinov,
S. K. Starov, A. V. Kononov, V. Yu. Kulakov, O. N. Petrova
TEST-SYSTEM BASED ON INDIRECT “SANDWICH” ELISA
TO DETECT THE LUMPY SKIN DISEASE VIRUS ANTIGEN

GENERAL ISSUES

58 V. A. Kalashnikova, A. V. Demerchyan
ANALYSIS OF PNEUMONIA-ASSOCIATED MORTALITY OF MONKEYS
IN CAPTIVITY AND THE ROLE OF METHICILLIN-SENSITIVE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS (MRSA) IN THE RECOVERED MICROFLORA SPECTRUM

63 G. S. Skitovich, N. B. Shadrova, O. V. Pruntova, K. V. Serova
REAL-TIME PCR OPTIMIZATION FOR LISTERIA MONOCYTOGENES
GENOME DETECTION

69 Ye. G. Kokorina, E. I. Elizbarashvili
COMPARATIVE STUDIES OF FELINE VIRAL RHINOTRACHEITIS VIRUS
FOR ITS REPLICATION PROPERTIES IN DIFFERENT CELL CULTURES



ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА p30 НА РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ *IN VITRO*

Али Мазлум¹, И. Ю. Жуков², А. С. Першин³, А. С. Иголкин⁴, Н. Н. Власова⁵

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

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

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

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

⁵ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Средства специфической профилактики при африканской чуме свиней пока не разработаны. Для определения составных компонентов, которые могут быть использованы при создании надежной защиты от АЧС, необходимо изучить функцию определенного белка вируса, его роль в морфогенезе и индукции иммунного ответа. Установлено, что белки p54 и p30 участвуют в вирусном проникновении и интернализации и способны индуцировать образование протективных антител у иммунизированных свиней. Введение этих белков в инфицированную вирусом АЧС культуру клеток в разной степени воздействует на репродукцию вируса. Представлены результаты изучения влияния очищенного рекомбинантного белка p30, полученного из клона *E. coli* с плазмидой pET32b(+)/p30, на репродукцию вируса африканской чумы свиней *in vitro*. Наибольшее снижение, вплоть до полной ингибиции, репродукции вируса наблюдали при внесении 300 нг p30 в первичные культуры клеток селезенки свиньи и костного мозга свиньи, инфицированные изолятом Krasnodar 07/17 вируса африканской чумы свиней в дозе 100 ГАД₅₀ на матрас (~ 0,01 ГАД₅₀ на клетку). Отмечено, что при внесении в образец смеси p30 и p54 снижение репродукции было существеннее, чем с использованием только p30.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, клонирование, рекомбинантный белок p30, репродукция вируса *in vitro*.

UDC 619:578.842.1:578.2

EFFECT OF p30 RECOMBINANT PROTEIN ON AFRICAN SWINE FEVER VIRUS *IN VITRO* REPRODUCTION

Ali Mazloun¹, I. Yu. Zhukov², A. S. Pershin³, A. S. Igolkin⁴, N. N. Vlasova⁵

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

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

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

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

⁵ Chief Researcher, Doctor of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

SUMMARY

African swine fever specific prevention means have not been developed yet. However, it is necessary to study the function of definite viral proteins, their role in immune response morphogenesis and induction to determine the components to be included into ASF protection drugs. It was established that p54 and p30 proteins participate in virus penetration and internalization and are able to induce protective antibodies in immunized pigs. The inoculation of these proteins into ASFV-infected cell culture has an impact on virus reproduction to different extents. The results of the study of purified recombinant protein p30 effect, derived from *E. coli* clone, containing pET32b(+)/p30 plasmid, on ASFV *in vitro* reproduction are presented. The greatest decrease, including complete inhibition of virus reproduction, was observed when 300 ng of p30 were inoculated into porcine spleen and marrow primary cell cultures, infected with the ASFV Krasnodar 07/17 isolate at the dose of 100 HAU per plate (~ 0.01 HAU per cell). It was noted that if the mixture of p30 and p54 was inoculated into a sample, the virus reproduction was greater compared to the use of only p30.

Key words: African swine fever, cloning, p30 recombinant protein, *in vitro* virus reproduction.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних лет большое количество исследовательских групп усиленно работают над созданием средств специфической профилактики африканской чумы свиней (АЧС) как на основе живого аттенуированного или инактивированного вируса, так и по получению рекомбинантной, субъединичной или ДНК-вакцины. С учетом результатов изучения защитных свойств разработанных экспериментальных вакцин ни один из препаратов для коммерческого производства не получил положительной оценки своего потенциала.

Несмотря на это, разработка субъединичной вакцины с использованием рекомбинантных белков и ДНК-вакцин остается одними из самых актуальных подходов при создании экологически безопасных средств специфической профилактики при АЧС. В результате экспериментов показано, что для определения составных компонентов, которые могут быть использованы при создании надежной защиты от АЧС, необходимо изучить функцию определенного белка вируса, его роль в морфогенезе и индукции иммунного ответа.

В 1998 г. Р. Gómez-Puertas и соавт. установили, что белки р54 и р30 вируса АЧС способны индуцировать образование протективных антител у иммунизированных свиней. В ходе исследований определили, что р54 отвечает за специфическое связывание вирусных частиц с макрофагом и проникновение их в клетку, а белок р30 играет ведущую роль в интернализации вируса. Введение этих белков в инфицированную вирусом АЧС культуру клеток в разной степени воздействует на репродукцию вируса *in vitro* [10].

Е. R. Tulman и соавт. (2009) показали возможность ингибции размножения вируса АЧС и задержки гемадсорбции при использовании сывороток к рекомбинантным белкам р54 и р30 [6].

Другой группой исследователей было продемонстрировано, что введение ДНК-вакцины, созданной на основе плазмидной ДНК рСМV-PQ, несущей гены р54 и р30, индуцирует выработку антител у мышей [8].

Как отмечалось ранее, использование белков р54 и р30 в рассмотренных экспериментах не случайно, так как они являются структурными протеинами, участвующими в вирусном проникновении и интернализации, хотя их роль существенно различается.

р30 – один из ранних вирусных белков, который кодируется геном CP204L, имеет молекулярную массу 30 кДа и является одним из наиболее иммуногенных структурных белков, ответственных за интернализацию вируса АЧС [4]. Экспрессия этого белка, как правило, начинается через 2–4 ч после заражения и продолжается в течение всего цикла репродукции. Таким образом, наличие синтеза р30 указывает на то, что вирус проник в клетку, утратил свою оболочку и началась экспрессия раннего гена CP204L [7].

р54 – белок, кодируемый геном E183L, является антигенно вариабельным структурным белком, отвечающим за прикрепление и проникновение вируса АЧС, и имеет молекулярную массу от 25 до 28 кДа [5].

Следует отметить, что вакцины на основе рекомбинантных белков, модифицированных вирусов и ДНК индуцируют клеточный и гуморальный иммунный ответ к вирусу АЧС, однако на сегодняшний день их применение не дает 100% защиты от заражения. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования для определения протективных белков, которые могут быть включены в субъединичную или рекомбинантную вакцину, а также для установления оптимальных иммунных механизмов, которые необходимо активировать для обеспечения надежной защиты от АЧС.

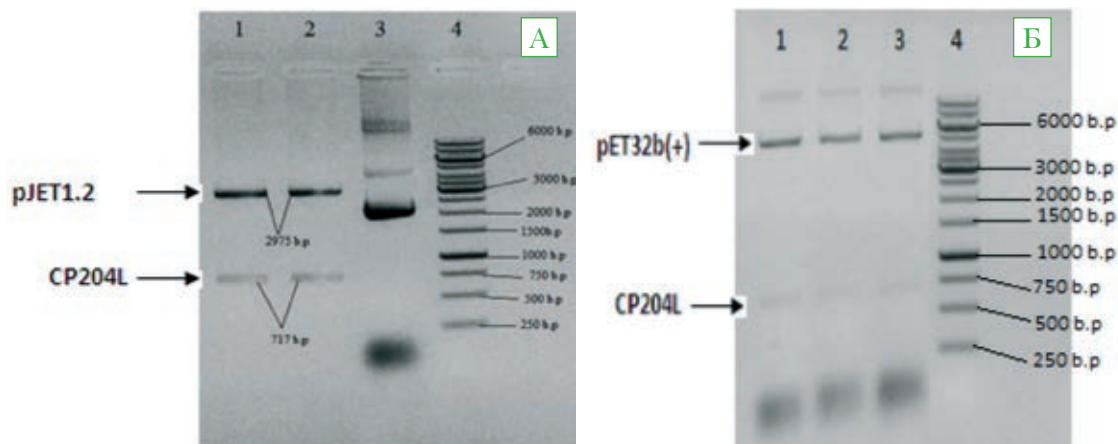
Целью данной работы был сравнительный анализ влияния интродукции рекомбинантного белка р30 и антител к белку р30 на репродукцию вируса АЧС *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника геномной ДНК использовали изолят Krasnodar 07/17 вируса АЧС, выделенный в июле 2017 г. из пробы селезенки от павшей на территории Краснодарского края домашней свиньи.

Рис. 1. Рестрикционный анализ плазмид для определения ориентации и размера встройки

А (для плазмиды рJET1.2-р30): треки 1 и 2 – электрофорез рJET1.2-р30 после рестрикции; трек 3 – рекомбинантная рJET1.2/р30; трек 4 – маркер 1к (Thermo Fisher) с линейкой фрагментов от 10 000 до 250 п. о.;
Б (для плазмиды рET32b(+)-р30): треки 1, 2 и 3 – рET32b(+)-р30 после рестрикции; трек 4 – маркер 1к (Thermo Fisher).



Накопление вируса осуществляли путем пассирования в первичной культуре клеток селезенки свиньи (СС) или костного мозга свиньи (КМС) в течение 2–3 пассажей.

Из вирусосодержащей суспензии, полученной после 2-го или 3-го пассажа, проводили выделение вирусной ДНК с помощью набора «ДНК-сорб-Б» (ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Дизайн праймеров осуществляли с помощью следующих web-ресурсов: для анализа нуклеотидных последовательностей генома штаммов и изолятов вируса АЧС использовали международные базы данных NCBI и EMBL; сравнительный анализ гомологии нуклеотидных последовательностей генов проводили с помощью программ BioEdit, версия 7.2.5, и Benchling.

Амплификацию гена CP204L вируса АЧС проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией.

Учет результатов реакции проводили методом электрофоретического разделения в 1,0%-м агарозном геле с детектированием в УФ-свете после окраски бромистым этидием.

Клонирование ПЦР-продукта проводили в неэкспрессирующем векторе pJET1.2/blunt с использованием клеток *E. coli* штамма JM-109, согласно руководству CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher, США).

ПЦР-продукт или фрагмент рестрикции ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора реагентов для элюции ДНК из агарозных гелей (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя.

Реклонирование гена CP204L проводили в экспрессирующий вектор pET32b(+) с использованием клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS (Promega, США).

Получение рекомбинантного белка р54, а также клонирование ПЦР-продукта проводили в неэкспрессирующем и экспрессирующем векторах с использованием клеток *E. coli*.

Для быстрой оценки экспрессии рекомбинантного белка использован анализ суммарного клеточного белка с помощью SDS-PAGE-электрофореза в 10% ПААГ по U. K. Laemmli (1970) [9].

Очистку рекомбинантного белка осуществляли с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозном сорбенте (Sigma, США).

Определение концентрации общего белка проводили по методу Бредфорда и с использованием графика на основе определения коэффициента поглощения.

Для изучения влияния белка р30 на репродукцию вируса АЧС *in vitro* использовали первичную культуру клеток КМС и культуру клеток СС.

Уровень репродукции вируса АЧС в культуре клеток оценивали в реакции гемадсорбции и с помощью тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции

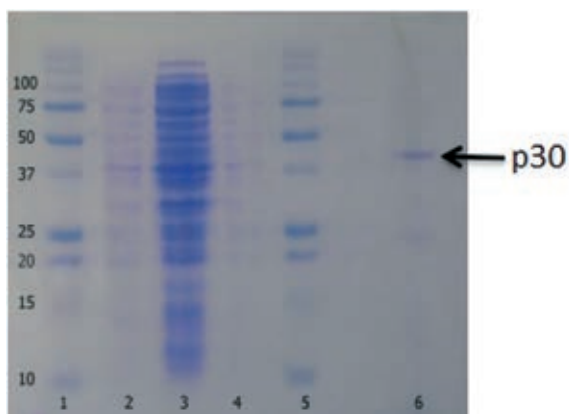


Рис. 2. Электрофореграмма в 10%-й ПААГ, отражающая эффективность очистки белка р30 на Ni-сефарозном сорбенте 1 и 5 – маркеры; 2 и 4 – пустые карманы; 3 – лизат клеток с р30; 6 – очищенный р30.

(ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований амплифицирован ПЦР-продукт, включающий в себя последовательность полноразмерного гена CP204L. По результатам секвенирования, проведенного Н. Г. Зиняковым (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), нуклеотидный состав полученного гена имел 100%-ю гомологию с аналогичной последовательностью референтного штамма Georgia 2007/01 вируса АЧС [3].

После проведения клонирования гена CP204L в pJET1.2/blunt определили его ориентацию методом рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз XhoI и NcoI. Методом электрофоретического разделения в 1%-м агарозном геле установили размер гена и получили продукт для последующего реклонирования в экспрессирующий вектор pET32b(+) (рис. 1).

Эффективность очистки белка р30 на Ni-сефарозном сорбенте определяли с помощью SDS-PAGE-электрофореза в 10%-м ПААГ, сравнивая с исходным клеточным лизатом (рис. 2).

Концентрацию очищенного белка определяли с помощью спектрофотометра, используя градиент разведений альбумина в физиологическом растворе (табл. 1, график 1).

Таким образом, в результате очистки белка получено 3,2 мл р30 с концентрацией 765 нг/мкл.

Затем определяли характер влияния р30 на репродукцию вируса АЧС *in vitro*. Для этого из матрасов

Таблица 1

Показатели оптической плотности для разных концентраций альбумина

Концентрация альбумина, нг/мкл	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Количество физраствора, мкл	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
Показатель A280	0	0,069	0,109	0,183	0,244	0,274	0,371	0,418	0,491	0,543	0,617

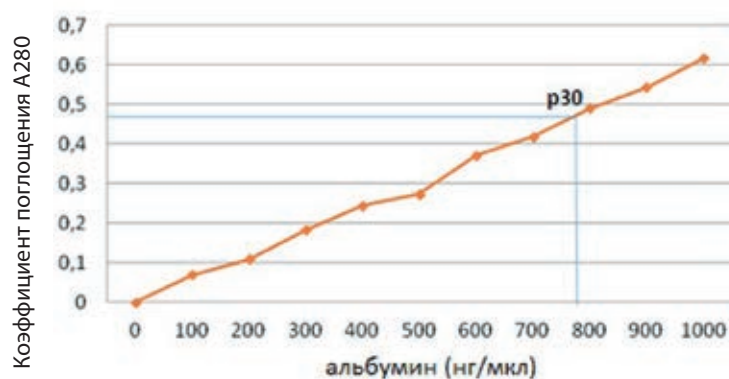


Рис. 3. Определение коэффициента поглощения проб бычьего сывороточного альбумина

с выросшим монослоем клеток удаляли ростовую питательную среду, вносили белок в дозах 100, 200 и 300 нг на матрас объемом 25 см³ и инкубировали на шейкере при 37 °C в течение 1 ч. Далее добавляли питательную среду по 10 мл в каждый матрас и инфицировали культуру клеток изолятом Krasnodar 07/17 вируса АЧС в дозе 100 ГАДЕ на матрас (~ 0,01 ГАДЕ на клетку). В качестве контроля воздействия на репродукцию вируса АЧС использовали полудан в дозе 100 нг на матрас [1], а в качестве отрицательного контроля добавляли 100 нг бычьего сывороточного альбумина. Каждый опыт проводили в четырех параллелях: два матраса с культурой клеток СС и два – с КМС.

Все пробы инкубировали в течение 7 сут при 37 °C и регистрировали появление гемадсорбции с помощью светового микроскопа. На 3, 5 и 7-е сут из каждого матраса отбирали по 200 мкл культуральной жидкости для исследования в реакции гемадсорбции и методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Результаты исследований представлены в таблице 2.

В таблице приведены усредненные значения по 4 пробам.

Все результаты рассчитывали по формуле средне-квадратического отклонения:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}.$$

Таблица 2

Оценка влияния концентрации вносимого белка на уровень репродукции вируса АЧС по значению порогового цикла (Ct)
n = 4

Белок/концентрация	ПЦР-РВ (Ct)		
	3-е сут	5-е сут	7-е сут
p30/100 нг	22,2 ± 1,1	16,02 ± 0,31	13,36 ± 0,27
p30/200 нг	19,3 ± 0,5	16,13 ± 0,41	13,5 ± 0,15
p30/200 нг + p54/200 нг	27,8 ± 0,67	24,13 ± 0,59	19,8 ± 0,51
p30/300 нг	22,5 ± 0,31	22,38 ± 0,29	25,22 ± 0,57
полудан/100 нг	21,9 ± 0,61	15,9 ± 0,44	13,14 ± 0,26
альбумин/100 нг	18,4 ± 0,42	12,05 ± 0,6	10,03 ± 0,33
Контроль культуры клеток	—	—	—

Результаты эксперимента по изучению влияния разных количеств белка р30 на уровень репродукции вируса *in vitro* представлены на графике, построенном по данным определения титра вируса в реакции гемадсорбции и ПЦР-РВ (рис. 4).

Как видно из результатов экспериментов (рис. 4), внесение 100 нг р30 и 100 нг полудана приводит к равнозначному эффекту в изменении уровня репродукции вируса АЧС, т. е. значительно снижает его титр в пробе. Интродукция 200 нг р30 приводила к аналогичному результату к 7-м сут после инфицирования. Однако при внесении в образец смеси 200 нг р30 и 200 нг р54 снижение репродукции вируса было существеннее, чем с использованием только 200 нг р30. Самое значительное воздействие на репродукцию вируса наблюдали при добавлении 300 нг р30, причем полную ингибицию репродукции вируса регистрировали на протяжении всего эксперимента (7 сут).

В работе А. С. Казаковой (2012) для изучения репродукции вируса АЧС *in vitro* в аналогичных экспериментах использовалась моноспецифическая сыворотка, полученная путем иммунизации кроликов рекомбинантным белком р30. Автором установлено, что антитела моноспецифической сыворотки крови кролика к Рес р30е штамма NVL-1 вируса АЧС в разведении 1:8 задерживали появление гемадсорбции до 5 сут [2].

В результате проведенных исследований установлено, что введение р30 оказало большее влияние на репродукцию вируса АЧС, вплоть до полной ингибиции, чем внесение моноспецифической сыворотки к белку р30. Данные различия объясняются прямым блокированием белком р30 стадии интернализации вируса, а следовательно, и его репродукции. В процессе введения белка р30 в культуру инфицированных клеток вирус АЧС и белок р30 конкурируют за клеточные рецепторы, отвечающие за интернализацию вируса. Поскольку белок р30 блокирует клеточные рецепторы, нарушается стадия проникновения вируса, результатом чего является снижение или полная ингибиция репродукции вируса.

В свою очередь, введение антител к р30 лишь частично блокирует эту стадию репродукции вируса путем связывания вирионного и синтезированного вновь на ранней стадии белка. Вследствие такого вероятного

взаимодействия с белком р30 антитела к нему оказывают менее значительное влияние на репродукцию вируса и приводят лишь к задержке появления гемадсорбции.

Таким образом, анализ двух различных подходов к изучению репродукции вируса АЧС *in vitro* подтвердил целесообразность, приоритетность и необходимость их использования для изучения особенностей репродукции вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку белок р30 играет важную роль в прикреплении и проникновении вируса АЧС в клетки, введенный в культуру клеток, он конкурирует с вирусными белками за рецепторы, ответственные за проникновение и внутриклеточный транспорт вируса. Следовательно, он блокирует стадию интернализации вируса в клетке.

Этот феномен проявляется *in vitro* при добавлении рекомбинантного белка р30 в культуры клеток селезенки свиньи и костного мозга свиньи, в то время как при добавлении альбумина в качестве контроля изменения уровня его репликации не наблюдается.

Таким образом, было достоверно установлено снижение репликации вируса АЧС при интродукции рекомбинантного белка р30 в культуры клеток. Следует отметить наличие дозозависимого эффекта, поскольку внесение 100 или 200 нг р30 приводило к значительному снижению уровня накопления вируса в пробе, а при добавлении 300 нг р30 наблюдалась полная ингибция репродукции вируса в течение всего срока наблюдения (7 сут). Примечательно, что при внесении в образец смеси р30 и р54 снижение репродукции было существеннее, чем с использованием только р30.

Очевидно, что данный способ позволит выявить влияние на репликацию и других белков вируса АЧС с неизвестной функцией, что необходимо для определения основных протективных белков, а также для установления оптимальных иммунных механизмов, обуславливающих надежную защиту от АЧС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние полудана на репродукцию вирусов репродуктивно-респираторного синдрома, трансмиссивного гастроэнтерита и африканской чумы свиней в первичных и перевиваемых культурах клеток / Д. В. Шарыпова, И. Ю. Жуков, Али Мазлум [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1 (24). – С. 37–41.
2. Казакова А. С. Конструирование продуцентов рекомбинантных белков р72, р30 и р54 вируса африканской чумы свиней: дис. ... канд. биол. наук. – Покров, 2013. – 125 с.
3. Клонирование генов, кодирующих трансмембранные белки и белки, ответственные за вирулентность вируса африканской чумы свиней / Али Мазлум, Н. Г. Зиняков, А. С. Иголкин, Н. Н. Власова // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 2 (25). – С. 3–7; doi: 10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7.
4. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis / E. G. Sánchez, A. Quintas, M. Nogal [et al.] // Virus Res. – 2013. – Vol. 173, No. 1. – P. 58–75; doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.025.
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. African swine fever virus / E. R. Tulman, G. A. Delhon, B. K. Ku, D. L. Rock // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2009. – Vol. 328. – P. 43–87; doi: 10.1007/978-3-540-68618-7-2.
7. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection / P. Lithgow, H. Takamatsu, D. Werling [et al.] // Vet. Microbiol. – 2014. – Vol. 168, No. 2–4. – P. 413–419; doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.001.
8. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells / J. M. Argilagué, E. Pérez-Martín, C. Gallardo [et al.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29, No. 33. – P. 5379–5385; doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.084.

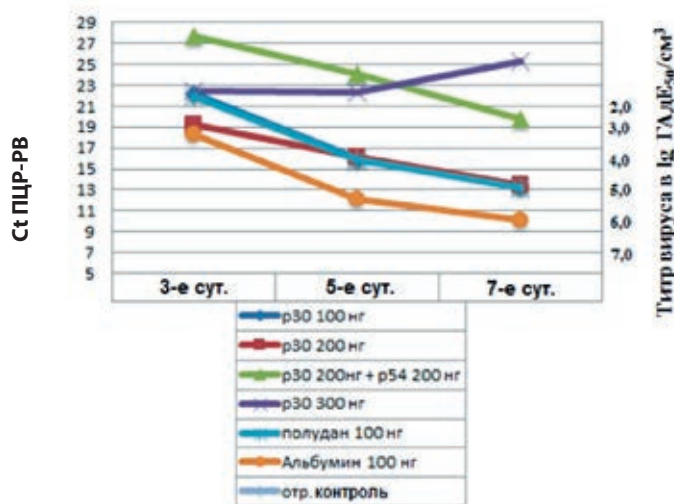


Рис. 4. Влияние р30 вируса АЧС на репродукцию вируса *in vitro*

9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, No. 5259. – P. 680–685.
10. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response / P. Gómez-Puertas, F. Rodríguez, J. M. Oviedo [et al.] // *Virology*. – 1998. – Vol. 243, No. 2. – P. 461–471; doi.org/10.1006/viro.1998.9068.

REFERENCES

1. Poludanum's influence on reproductive and respiratory syndrome, transmissible gastroenteritis and African swine fever viruses in primary and continuous cell cultures. D. V. Sharypova, I. Yu. Zhukov, Ali Mazloun [et al.]. *Veterinary Science Today*. 2018; 1 (24): 37–41.
2. Kazakova A. S. Construction of African swine fever virus recombinant proteins p72, p30 and p54: Candidate Thesis (Biology). Pokrov; 2013 (in Russian).
3. Cloning of genes, coding for transmembrane proteins and proteins, responsible for African swine fever virus virulence. Ali Mazloun, N. G. Zinyakov, A. S. Igolkina, N. N. Vlasova. *Veterinary Science Today*. 2018; 2 (25): 3–7; doi: 10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7.
4. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. E. G. Sánchez, A. Quintas, M. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nogal%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23154157" Nogal [et al.]. *Virus Res*. 2013; 173 (1): 58–75; doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.025.
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; 78 (8): 4299–4313; doi: 10.1128/JVI.78.8.4299–4313.2004.
6. African swine fever virus. E. R. Tulman, G. A. Delhon, B. K. Ku, D. L. Rock. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2009; 328: 43–87; doi: 10.1007/978-3-540-68618-7-2.
7. Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection. P. Lithgow, H. Takamatsu, D. Werling [et al.]. *Vet. Microbiol*. 2014; 168 (2–4): 413–419; doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.001.
8. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. J. M. Argilague, E. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=P%26C%26A9rez-Mart%26C%26A20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21679736" Pérez-Martín, C. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gallardo%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21679736" Gallardo [et al.]. *Vaccine*. 2011; 29 (33): 5379–5385; doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.084.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680–685.
10. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. P. Gómez-Puertas, F. Rodríguez, J. M. Oviedo [et al.]. *Virology*. 1998; 243 (2): 461–471; HYPERLINK "https://doi.org/10.1006/viro.1998.9068" "Persistent link using digital object identifier" doi.org/10.1006/viro.1998.9068.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 01.08.18

РАЗРАБОТКА И ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЭПИЗОТИЧЕСКОЙ ДИАРЕИ СВИНЕЙ

А. В. Каншина¹, А. С. Яковлева², Е. С. Орлова³, А. В. Щербakov⁴

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

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

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

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

РЕЗЮМЕ

Распространение эпизоотической диареи свиней и возросшая угроза свиноводству диктуют необходимость разработки современных методов диагностики болезни. Перспективным является использование в серологических тестах рекомбинантных антигенов возбудителя болезни. На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу эпизоотической диареи свиней. В результате проведенных исследований были установлены все необходимые условия реакции. В процессе валидации определены основные характеристики разработанного метода. Прецизионность реакции в условиях повторяемости и воспроизводимости превышала 90%, диагностическая специфичность составляла 99,47%, чувствительность относительно коммерческого набора ID Screen PEDV Indirect (IDvet, Франция) при очень хорошей согласованности двух методов (k -критерий – 0,88) – 92%. Тест-система характеризуется высокой устойчивостью при смене ключевого компонента реакции.

Ключевые слова: эпизоотическая диарея свиней, антитела, иммуноферментный анализ.

UDC 619:616.98:578.834.1:636.4:616-078:616-097

DEVELOPMENT AND BASIC FEATURES OF INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA

A. V. Kanchina¹, A. S. Yakovleva², Ye. S. Orlova³, A. V. Scherbakov⁴

¹Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vavilova@arriah.ru

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

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

⁴Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

SUMMARY

Spread of porcine epidemic diarrhea and its increased threat for the pig industry necessitate development of advanced techniques for the disease diagnosis. Use of recombinant antigens of the disease agent seems prospective. The recombinant antigen-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay has been developed for the detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus. The research performed allowed for determination of all necessary test conditions. Basic features of the developed method were determined during its validation. The test precision was above 90% pursuant to its repeatability and reproducibility, diagnostic specificity of the test amounted to 99.47%, and its sensitivity as compared to commercial ID Screen PEDV Indirect (IDvet, France) was 92% with very good compatibility of the two tests (k -criterion – 0.88) – 92%. The test-system demonstrates high stability upon the change of the key test component.

Key words: porcine epidemic diarrhea, antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay.

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая диарея свиней (ЭДС) – острое кишечное заболевание, характеризующееся рвотой и диареей с водянистым поносом. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус семейства *Coronaviridae* [1, 3].

К заболеванию восприимчивы свиньи всех возрастных групп. Острое течение болезни наблюдается при первичном попадании инфекции в хозяйство. По симптомам ЭДС напоминает типичную вспышку трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС). Смертность в результате дегидратации среди 1–14-суточных поросят-сосунков может достигать 90% [2, 13].

Заболевание наносит свиноводству большой экономический ущерб, обусловленный высокой смертностью поросят, а также снижением привеса свиней из группы откорма вследствие угнетения аппетита после выздоровления [3].

ЭДС известна с 1970-х гг., долгое время ее ареал ограничивался Европой и некоторыми азиатскими странами. В 2013 г. ЭДС впервые была занесена в США, где нанесла значительный ущерб свиноводству. Вскоре болезнь распространилась на территорию Канады и Мексики. Массовые эпизоотии ЭДС были зарегистрированы в последние годы также в Китае, Южной Корее, Японии [11].

Глобальное распространение ЭДС и возросшая угроза свиноводству делают актуальной проблему разработки современных методов диагностики болезни.

Для обнаружения антител против вируса ЭДС используются такие серологические методы, как реакция нейтрализации, иммуногистохимия, иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ (ИФА). Многие из этих методов основаны на использовании нативного вирусного антигена [5, 7, 9]. Перспективным является использование в серологических тестах рекомбинантных антигенов возбудителя ЭДС.

Основными структурными белками вируса ЭДС являются белок Spike (S), нуклеокапсидный протеин (N) и мембранный протеин (M). Было показано, что данные белки содержат антигенные детерминанты и могут использоваться в качестве антигенов в иммунологических реакциях [8, 12, 13]. Белок N является наиболее консервативным по аминокислотному составу у различных изолятов вируса ЭДС [11]. Ранее в ФГБУ «ВНИИЗЖ» был получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса ЭДС и отработаны условия его синтеза в *E. coli* [4].

Цель данной работы заключалась в разработке непрямого ИФА на основе рекомбинантного антигена и определении основных характеристик реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В качестве антигена для ИФА использовали рекомбинантный белок вируса ЭДС, полученный ранее [4].

Сыворотки крови. В работе использовали сыворотки крови свиней, полученные из хозяйств, благополучных и неблагополучных по ЭДС. В качестве гетерологичных использовали сыворотки крови от свиней, вакцинированных против репродуктивно-респираторного синдрома свиней, классической чумы свиней, ТГС и др.

Конъюгат антивидовых антител. В работе использовали пероксидазный конъюгат против иммуноглобулина G свиньи (Sigma, США).

Непрямой вариант ИФА. Разработка непрямого варианта ИФА на основе рекомбинантного антигена со-

ставляла предмет исследований, поэтому схема ЭДС-ИФА описана в разделе «Результаты и обсуждение».

ИФА с использованием коммерческих наборов. В работе использовали импортный коммерческий набор ID Screen PEDV Indirect (IDvet, Франция). Постановку ИФА осуществляли в соответствии с инструкцией к тест-системе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка непрямого варианта ИФА для обнаружения антител к вирусу ЭДС включала несколько этапов.

Определение антигенной активности рекомбинантного белка вируса ЭДС и оптимизация условий постановки непрямого варианта ИФА. Очищенный препарат рекомбинантного белка вируса ЭДС использовали для изучения его антигенной активности и специфичности. С этой целью методом последовательных разведений в ИФА вносили антиген в сенсibiliзирующем буфере. Для сенсibilизации использовали буферные растворы: карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,6 (КББ) и карбонатно-бикарбонатный буфер с добавлением 50 мМ 1,4-дифенил-2,3,5-трисубstitированного бензола (ДТТ), pH 9,6 (КББ + ДТТ). Сорбированные планшеты инкубировали 16–18 ч при температуре 4–8 °С. Затем один из планшетов отмыли от несвязавшегося антигена три раза по 300 мкл на лунку фосфатно-буферным раствором (ФБР), другой только обсушили и внесли блокирующий буфер. В качестве положительной и отрицательной контрольных сывороток использовали пробы, предварительно протестированные с помощью коммерческого набора ID Screen PEDV.

Результаты проверки антигенной активности рекомбинантного белка вируса ЭДС отражены в графической форме на рисунках 1 и 2.

Как видно из рисунков 1 и 2, состав сорбирующего буфера на антигенную активность рекомбинантного белка не влиял – рабочее разведение антигена для сенсibilизации предложенных буферов составило 1:800, что соответствует концентрации белка 0,032 мкг/мл. Влияние оказывал этап отмыывания планшета от несвязавшегося антигена. Поэтому далее в качестве сорбирующего применяли карбонатно-бикарбонатный буфер, а планшеты от несвязавшегося антигена отмывали.

Для выбора блокирующего буфера использовали восемь различных составов: 10%-й, 5%-й, 3%-й растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10%-й, 5%-й растворы нормальной сыворотки крови лошади и 10%-й, 3%-й и 1%-й растворы сухого обезжиренного молока. Компоненты растворяли в ФБР, pH доводили до 7,3–7,6. После серии экспериментов количества пригодных для блокирования буферов сократили до трех: 10%-й, 1%-й растворы молока и 10%-й раствор БСА. Эти три буфера использовали для определения оптимального времени инкубации сывороток и конъюгата. Измерения оптической плотности (ОП) проводили на трех отрицательных и четырех положительных пробах сывороток крови в четырех повторностях через 30, 45, 60 мин. Затем вычисляли среднее арифметическое значение ($\bar{x}$) ОП сывороток, среднее квадратичное отклонение (δ) и коэффициент вариации (c). Наилучшие результаты (коэффициент вариации менее 10%) получили при инкубации сывороток и конъюгата в течение 30 мин с использованием 1%-го раствора молока.

По результатам экспериментов в качестве оптимальной была выбрана следующая схема постановки ЭДС-ИФА: рекомбинантный антиген вируса ЭДС раз-

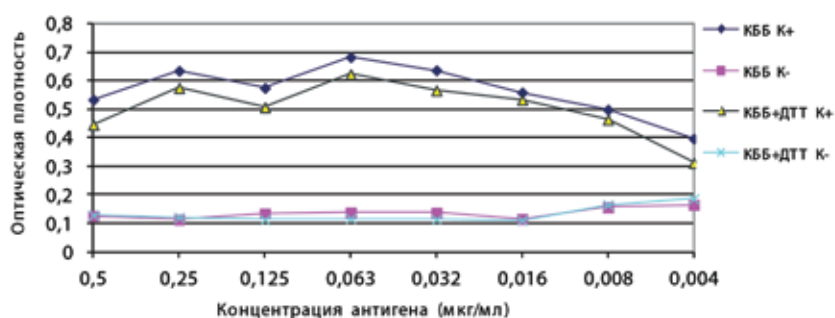


Рис. 1. Антигенная активность рекомбинантного белка в ЭДС-ИФА с контрольными сыворотками с отмытием антигена

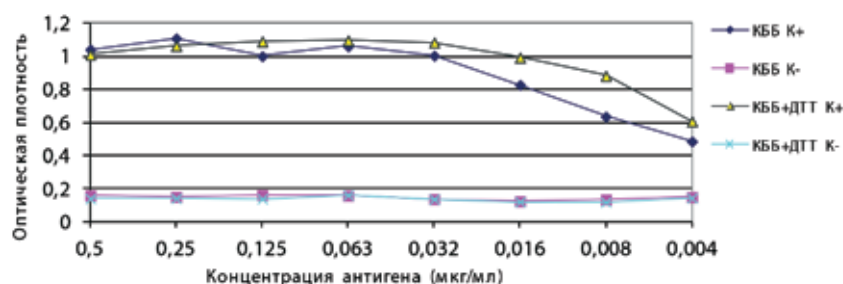


Рис. 2. Антигенная активность рекомбинантного белка в ЭДС-ИФА с контрольными сыворотками без отмытия антигена

водили в сорбирующем буфере (КББ, pH 9,6) и вносили по 50 мкл на лунку. Планшет с антигеном инкубировали при температуре 4–8 °С в течение 16–18 ч и отмывали трехкратно по 250–300 мкл на лунку ФБР. После высушивания вносили блокирующий буфер (1%-й раствор молока в ФБР, pH 7,3–7,4) и инкубировали в течение 60 мин в термощейкере при температуре 37 °С. Планшет вновь отмывали и вносили разведенные пробы сыворотки крови в буфере для разведения проб и конъюгата (1%-й раствор молока в ФБР, pH 7,3–7,4), инкубировали в термощейкере в течение 30 мин при температуре 37 °С и скорости вращения 750 об/мин. После отмывания планшета вносили конъюгат в рабочем разведении и инкубировали, как описано выше. Реакцию окрашивали раствором 2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоновой кислоты, останавливали 1%-м раствором додецилсульфата натрия. Реакцию учитывали с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм.

Выбор величины рабочего разведения сыворотки крови свиней при тестировании проб в одном разведении. Для определения оптимального разведения тестировали пробы сыворотки крови с различным уровнем антител к вирусу ЭДС методом последовательных разведений в ИФА, начиная с 1:20 до 1:1280.

Реакцию ЭДС-ИФА проводили по схеме, описанной выше.

Для всех разведений исследуемых сывороток (85 проб) вычислили процент позитивности и определили конечный титр.

За конечный титр принимали последнее разведение сыворотки, ОП которой равнялась или была выше удвоенного значения средней ОП отрицательной контрольной сыворотки.

Процент позитивности (ПП) вычисляли по формуле

$$\text{ПП} = (\text{ОП} - \text{NC}_x) / (\text{PC}_x - \text{NC}_x) \times 100\%,$$

где ОП – оптическая плотность исследуемой сыворотки; NC_x – оптическая плотность отрицательного контроля; PC_x – оптическая плотность положительного контроля.

Полученные результаты обработали с помощью компьютерной программы Statistica, которая позволила рассчитать коэффициент корреляции и стандартную ошибку. На основании этих показателей произвели выбор рабочего разведения сыворотки крови. Наиболее высокий коэффициент корреляции ($R = 0,9199$) с наименьшей стандартной ошибкой 0,07718 получили для разведения 1:40 при доверительном интервале 0,95.

Определение позитивно-негативного порога (ПНП). Для обоснования пороговых показателей, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специ-

Таблица 1
Оценка сходимости ЭДС-ИФА для одной пробы на трех планшетах

Постановка реакции	Минимальное значение ОП К ⁺ ($x_{\min}$)	Максимальное значение ОП К ⁺ ($x_{\max}$)	Среднее значение ОП К ⁺ ($\bar{x}$)	Среднее квадратичное отклонение (σ)	Коэффициент вариации (с), %
планшет № 1	0,672	0,920	0,817	0,049	6,0
планшет № 2	0,557	0,891	0,759	0,067	8,83
планшет № 3	0,572	0,911	0,802	0,068	8,48

фическую (положительную) реакции в ЭДС-ИФА, определяли значения ОП 92 образцов сыворотки крови, не имеющих антител к вирусу ЭДС.

ПНП определяли, рассчитывая среднее значение ОП отрицательных сывороток крови для выбранного разведения 1:40, с учетом двух и трех значений стандартного отклонения (σ). Было установлено, что сыворотки следует считать отрицательными, если ПП < 20%, положительными, если ПП $\geq$ 25%. ПП в интервале 20–25% оценивается как сомнительный результат.

Определение допустимых величин ОП контрольных сывороток. Исследовали 20 повторностей положительной и отрицательной сывороток крови свиней в разведении 1:40. Полученные выборки значений ОП позволили рассчитать соответствующие средние значения ОП, стандартные отклонения и 95%-й доверительный интервал.

Показано, что среднее значение для положительно-го контроля соответствует значению 0,999 (стандартное отклонение – 0,223), для отрицательного – 0,137 (стандартное отклонение – 0,036). Допустимыми значениями ОП контрольных сывороток при 95%-м доверительном интервале являются значения, лежащие в диапазоне: для положительного контроля – от 0,776 до 1,222, для отрицательного контроля – от 0,062 до 0,212 оптических единиц.

Таким образом, в результате проведенных исследований были определены все необходимые условия реакции.

На следующем этапе были проведены исследования, направленные на определение основных валидационных характеристик ЭДС-ИФА: аналитической и диагностической чувствительности и специфичности, устойчивости к смене реагентов, прецизионности в условиях повторяемости (сходимость) и воспроизводимости.

Оценка аналитической специфичности ЭДС-ИФА. Аналитическую специфичность рекомбинантного белка проверяли с сыворотками крови свиней, содержащих антитела к вирусам трансмиссивного гастроэнтерита свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней, классической чумы свиней, цирковирусной инфекции свиней 2-го типа, болезни Ауески. Активность белка с гетерогенными сыворотками не превышала фоновый уровень, полученный в реакции с неиммунной сывороткой.

Определение аналитической чувствительности. Использовали сыворотку крови свиньи, полученную от переболевшего данным заболеванием животного. Наличие антител подтвердили в коммерческом наборе фирмы IDvet.

Методом последовательных двукратных разведений в ЭДС-ИФА данную сыворотку тестировали в трех повторностях, титр сыворотки составил $9,32 \log_2$, что явилось пределом обнаружения для этого метода [6]. Для коммерческого набора фирмы IDvet предел обнаружения этой же сыворотки составил $8,32 \log_2$.

Определение прецизионности. В условиях повторяемости (сходимости) один образец сыворотки крови свиньи тестировали три раза в 96 повторностях (на трех планшетах), результаты представлены в таблице 1. Сходимость ЭДС-ИФА была оценена также при тестировании шести проб с разным уровнем антител в трех повторностях в рамках одной постановки теста (табл. 2).

Коэффициенты вариации во всех случаях составили менее 10%, что указывает на высокую сходимость результатов ЭДС-ИФА.

Прецизионность ЭДС-ИФА в условиях внутрилабораторной воспроизводимости (воспроизводимость) оценивали путем постановки контрольной пробы сыворотки крови в разные дни. Для этого в течение 20 дней исследовали положительную сыворотку крови и вычисляли среднее арифметическое процента позитивности, среднее квадратичное отклонение и коэффициент вариации. Эти показатели соответствовали значениям 100,0; 7,43 и 7,43. Низкое значение коэффициента вариации (менее 10%) доказывает, что разработанный метод обладает высокой воспроизводимостью [10].

Таким образом, оцененная прецизионность ЭДС-ИФА составила более 90% как в условиях повторяемости, так и в условиях воспроизводимости.

Определение устойчивости. Компоненты для ЭДС-ИФА, такие как сухое молоко, соли для приготовления буфера и др., стандартизированы фирмами-производителями.

Одним из основных компонентов, играющих значительную роль в реакции, является рекомбинантный антиген. Для проверки устойчивости метода при смене серий рекомбинантного антигена тестировали три образца сыворотки крови свиней (табл. 3).

Низкие коэффициенты вариации результатов ЭДС-ИФА для трех разных серий рекомбинантного антигена свидетельствуют о высокой устойчивости метода к смене ключевого реагента.

Таблица 2
Оценка сходимости шести проб в рамках одной постановки теста

№ пробы	Повторность	Оптическая плотность	Среднее квадратичное отклонение (σ)	Коэффициент вариации (c), %
1	1	0,786	0,005	0,6
	2	0,795		
	3	0,787		
2	1	0,446	0,011	2,41
	2	0,465		
	3	0,457		
3	1	0,598	0,052	9,5
	2	0,510		
	3	0,527		
4	1	0,125	0,006	4,65
	2	0,135		
	3	0,128		
5	1	0,185	0,014	7,6
	2	0,172		
	3	0,195		
6	1	0,105	0,002	1,9
	2	0,103		
	3	0,107		

Таблица 3
Устойчивость ЭДС-ИФА к смене серии рекомбинантного антигена

Серии рекомбинантного антигена	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Серия 1	1,095	0,998	0,116
Серия 2	1,062	0,926	0,112
Серия 3	1,005	0,855	0,119
Среднее значение ОП ($\bar{x}$)	1,054	0,926	0,116
Среднее квадратичное отклонение (σ)	0,053	0,085	0,004
Коэффициент вариации (c), %	5,03	9,18	3,45

Определение диагностической специфичности ЭДС-ИФА. Использовали полевые сыворотки крови свиней из хозяйств, благополучных по ЭДС. Из 1510 проб в ЭДС-ИФА положительный результат показали восемь проб, в коммерческом наборе IDVet эти пробы были отрицательными. Таким образом, диагностическая специфичность разработанного метода составила 99,47%.

Определение чувствительности ЭДС-ИФА. В связи с тем, что полевые штаммы вируса ЭДС не удается выделить в культуре клеток, не имели возможности провести экспериментальное заражение свиней с целью получения заведомо положительных сывороток, которые необходимы для определения диагностической чувствительности. Однако наличие коммерческих тест-систем для определения антител против вируса ЭДС позволило определить чувствительность разработанного метода относительно импортных диагностических наборов.

Для этого в ЭДС-ИФА исследовали 100 сывороток крови свиней, показавших положительный результат в наборе ID Screen PEDV Indirect. Сыворотки были отобраны в четырех хозяйствах, где были зарегистрированы клинические признаки ЭДС, а при лабораторных исследованиях патологического материала в ОТ-ПЦР был обнаружен вирус ЭДС. Разработанный ЭДС-ИФА обнаружил антитела к вирусу ЭДС в 92 пробах, четыре пробы показали сомнительный результат и четыре пробы – отрицательный. Таким образом, на данной панели сывороток чувствительность ЭДС-ИФА относительно тест-системы IDvet составила 92% при очень хорошей согласованности двух методов (k -критерий – 0,88).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе рекомбинантного антигена разработан не прямой вариант ИФА для обнаружения антител к вирусу ЭДС. В процессе валидации установлено, что разработанная тест-система характеризуется очень хорошей воспроизводимостью результатов, устойчивостью при смене ключевого компонента реакции, высокой специфичностью и чувствительностью, т. е. пригодна для использования в качестве метода серологической диагностики ЭДС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 2001. – 928 с.
2. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х. З. Гафаров, А. В. Иванов, Е. А. Непоклонов, А. З. Равилов. – Казань: Фен, 2002. – 592 с.
3. Пейсак З. Болезни свиней. – Брест: Брестская типография, 2008. – 424 с.

4. Яковлева А. С., Щербakov А. В. Получение рекомбинантного нуклеокапсидного белка вируса эпизootической диареи свиней // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2015. – Т. 13. – С. 89–95.

5. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection // J. S. Oh, D. S. Song, J. S. Yang [et al.] // J. Vet. Sci. – 2005. – Vol. 6, No. 4. – P. 349–352.

6. Development and optimization of antibody detection assays // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds, and Bees). – 2014. – Chap. 3.6.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIbody_DETECT.pdf.

7. Hofmann M., Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera // Vet. Microbiol. – 1990. – Vol. 21, No. 3. – P. 263–273. – URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90037-V](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90037-V).

8. Hou X. L., Yu L. Y., Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies // Vet. Microbiol. – 2007. – Vol. 123, No. 1–3. – P. 86–92. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.014>.

9. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods // F. Guscetti, C. Bernasconi, K. Tobler [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1998. – Vol. 5, No. 3. – P. 412–414.

10. Jacobson R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious disease // Rev. Sci. Tech. OIE. – 1998. – Vol. 17, No. 2. – P. 469–486.

11. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus // Virol. J. – 2015. – Vol. 12:193; DOI: 10.1186/s12985-015-0421-2.

12. Ren X., Suo S., Jang Y.-S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection // Biotechnol. Lett. – 2011. – Vol. 33, No. 2. – P. 215–220. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0420-8>.

13. Song D., Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines // Virus Genes. – 2012. – Vol. 44, No. 2. – P. 167–175; DOI: 10.1007/s11262-012-0713-1.

REFERENCES

1. Viral animal diseases [Virusnye bolezni zhivotnykh]. V. N. Syurin, A. Ya. Samuylenko, B. V. Solov'yev, N. V. Fomina. M.: VNIITBP; 2001 (in Russian).
2. Mono-infection and co-infection diarrheas in newborn calves and piglets [Mono- i smeshannyye infektsionnyye diarei novorozhdennykh teljat i porosyat]. H. Z. Gafarov, A. V. Ivanov, Ye. A. Nepoklonov, A. Z. Ravilov. Kazan: Fen; 2002 (in Russian).
3. Pejsak Z. Porcine diseases. Brest: Brest printing Office; 2008.
4. Yakovleva A. S., Scherbakov A. V. Recovery of recombinant nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2015; 13: 89–95 (in Russian).
5. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection. J. S. Oh, D. S. Song, J. S. Yang [et al.]. *J. Vet. Sci.* 2005; 6 (4): 349–352.
6. Development and optimization of antibody detection assays. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds, and Bees). 2014; Chap. 3.6.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIbody_DETECT.pdf.
7. Hofmann M., Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet. Microbiol.* 1990; 21 (3): 263–273. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90037-V](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90037-V).
8. Hou X. L., Yu L. Y., Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet. Microbiol.* 2007; 123 (1–3): 86–92. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.014>.
9. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. F. Guscetti, C. Bernasconi, K. Tobler [et al.]. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5 (3): 412–414.
10. Jacobson R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious disease. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 1998; 17 (2): 469–486.
11. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol. J.* 2015; 12: 193; DOI: 10.1186/s12985-015-0421-2.
12. Ren X., Suo S., Jang Y.-S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol. Lett.* 2011; 33 (2): 215–220. URL: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0420-8>.
13. Song D., Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*. 2012; 44 (2): 167–175; DOI: 10.1007/s11262-012-0713-1.

Поступила 20.04.18

Принята в печать 06.08.18

НЕПРЯМОЙ ВАРИАНТ ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К НЕСТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ЯЩУРА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

А. С. Яковлева¹, А. В. Каньшина², А. В. Щербаков³

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

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

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

РЕЗЮМЕ

Разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа, предназначенный для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней. В процессе валидации показано, что разработанный метод отличается высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью. При тестировании панели сывороток крови, полученных от экспериментально зараженных животных, метод позволил обнаружить антитела к вирусу ящура в 7 из 18 сывороток, отобранных на 6-й день после инфицирования, в 13 из 19 – на 7-й день после инфицирования, в 16 из 19 – на 8-й день после инфицирования и во всех 76 сыворотках, отобранных на 9–12-й день после инфицирования. Диагностическая специфичность ЗАВ-ИФА составила 100% при тестировании 100 заведомо отрицательных сывороток крови свиней, завезенных в РФ из Норвегии. Высокая специфичность и чувствительность метода, установленные на этапе разработки метода, подтверждены при проведении рутинных диагностических исследований.

Ключевые слова: вирус ящура, неструктурные белки, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая домашних и диких парнокопытных животных, в том числе и свиней. Заболевание относится к категории трансграничных болезней, способных вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3. В пределах каждого типа существует множество генетических и антигенных вариантов вируса.

В России ящур неэндемичен, однако существует постоянная угроза заноса болезни из соседних азиатских стран, прежде всего из Китая. В связи с этим в Российской Федерации применяется стратегия профилактики и борьбы с ящуром, которая предполагает недопущение возникновения и распространения болезни на территории страны. В регионах с высокой степенью риска заноса и распространения инфекции создана буферная зона, в которой крупный и мелкий рогатый скот вакцинируется против ящура. Для выявления инфицированных животных среди вакцинированного поголовья применяются методы, позволяющие обнаруживать в крови животных антитела к неструктурным белкам

вируса ящура. Такие антитела выявляются у инфицированных животных и не обнаруживаются у вакцинированных при условии применения очищенных вакцин, соответствующих требованиям Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) [5, 6].

Ранее в ФГБУ «ВНИИЗЖ» был разработан и валидирован непрямой вариант иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота [2]. Этот метод (ЗАВ-ИФА) уже несколько лет успешно применяется в диагностических и мониторинговых исследованиях.

В 2017 г. вступили в силу правила по регионализации территории РФ по ящуру. В соответствии с этими правилами животные могут перемещаться из зоны, где проводится вакцинация против ящура, в регионы без вакцинации только при условии отсутствия в их крови постинфекционных антител к вирусу ящура. Таким образом, при коммерческих операциях, связанных с перемещениями животных, обязательной стала проверка их инфекционного статуса на ящур [4].

Поскольку это правило распространяется и на свиней, в свиноводческих хозяйствах, оказавшихся в зоне с вакцинацией, стал востребованным тест, позволяющий исследовать сыворотки крови животных на наличие антител к вирусу ящура.

Таблица 1
Влияние состава блокирующего буфера на средние показатели оптической плотности контрольных сывороток
 $n = 4$

Блокирующий раствор	Показатели на антигенном ряду			Показатели на безантигенном ряду	
	ОП KS+	ОП KS-	S/N	ОП KS+	ОП KS-
Раствор молока:					
1%	1,19 ± 0,09	0,21 ± 0,01	5,63 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
3%	1,09 ± 0,08	0,16 ± 0,01	6,90 ± 0,07	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
10%	1,00 ± 0,08	0,15 ± 0,01	6,55 ± 0,06	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
БСА:					
1%	1,42 ± 0,09	0,35 ± 0,01	4,04 ± 0,08	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
3%	1,31 ± 0,05	0,38 ± 0,02	3,44 ± 0,06	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
10%	1,29 ± 0,09	0,34 ± 0,01	3,79 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Сыворотка лошадиная нормальная:					
1%	0,98 ± 0,08	0,24 ± 0,01	4,14 ± 0,08	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
3%	1,22 ± 0,04	0,29 ± 0,01	4,17 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01
10%	0,96 ± 0,05	0,19 ± 0,01	5,00 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01

Цель работы – разработка и валидация ЗАВ-ИФА, предназначенного для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В качестве антигена использовали рекомбинантный белок ЗАВ, полученный экспрессией в *E. coli*. Условия экспрессии и очистки описаны ранее [3].

Сыворотки крови животных. В качестве положительного контроля использовали референтную сыворотку крови свиньи, экспериментально зараженной вирусом ящура типа А, в качестве отрицательного контроля – сыворотку крови свиньи, не имеющей антител к вирусу ящура. Данные сыворотки были проверены на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура методом ИФА с использованием коммерческого набора PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария).

Для установления рабочего разведения сывороток, позитивно-негативного порога, диагностической чувствительности и специфичности реакции использовали сыворотки крови от свиней с известным инфекционным статусом. В качестве заведомо положительных проб были использованы 132 сыворотки крови свиней, экспериментально зараженных вирусом ящура, отобранные на 6–12-е сутки после инфицирования. Данные пробы были предоставлены сотрудниками референтной лаборатории диагностики ящура. В качестве заведомо отрицательных проб использовали сыворотки крови свиней, завезенных в РФ из Норвегии.

Конъюгат антивидовых антител. В работе использовали коммерческий пероксидазный конъюгат антител к иммуноглобулинам G свиней (Sigma).

Иммуноферментный анализ. Разработка ЗАВ-ИФА являлась предметом исследований и описана в разделе «Результаты и обсуждение». ИФА с использованием коммерческого набора PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария) проводили в соответствии с инструкцией к набору.

Статистическую обработку результатов ИФА проводили согласно рекомендациям МЭБ [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация реагентов и протокола реакции.

Были установлены рабочие разведения антигена и антивидового конъюгата, оптимальный состав блокирующего раствора, температурно-временной режим для каждого этапа ИФА, допустимые значения оптической плотности (ОП) контрольных сывороток.

Рабочее разведение антигена и антивидового конъюгата определяли шахматным титрованием с использованием положительной и отрицательной сывороток. За рабочее разведение антигена и конъюгата принимали значение, при котором ОП положительной контрольной сыворотки находилась в пределах 1,0–1,1, отрицательной контрольной сыворотки – в пределах 0,08–0,19. Рабочее разведение антигена составило 2 мкг/мл, рабочее разведение конъюгата анти-IgG свиней составило 1:20 000.

При выборе блокирующего раствора проверяли 1%-е, 3%-е и 10%-е обезжиренное молоко и 10%-ю лошадиную сыворотку на основе буфера ТБС, содержащего 0,01% Твина-20. Выяснили, что использование 3%-го и 10%-го обезжиренного молока в блокирующем буфере и для разведения образцов является наиболее оптимальным (табл. 1).

Для определения оптимального рабочего разведения сывороток тестировали 47 сывороток крови свиней с различным уровнем антител методом последовательных разведений в четырех различных разведениях: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160. Для каждого разведения сывороток определяли величину (S/P) по формуле

$$S/P = (ОП - NC_x) / (PC_x - NC_x),$$

где ОП – средняя оптическая плотность исследуемой сыворотки;

NC_x – средняя оптическая плотность отрицательной контрольной сыворотки;

PC_x – средняя оптическая плотность положительной контрольной сыворотки.

Затем рассчитывали Ig S/P и Ig T для каждого разведения. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica. В результате были определены коэффициенты корреляции (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, наибольший коэффициент корреляции $R = 0,87$ при наименьшей стандартной ошибке 0,66646 получили при разведении сывороток 1:80. Поэтому данное разведение было выбрано в качестве рабочего.

Уравнение линейной регрессии для разведения сывороток 1:80 имело вид:

$$\lg T = 2,9941 + 1,3653 \times \lg S/P,$$

где 2,9941 и 1,3653 – коэффициенты А и В соответственно.

На рисунке представлен график зависимости $\lg S/P$ от $\lg T$ для рабочего разведения сывороток 1:80.

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема постановки ЗАВ-ИФА. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рекомбинантного белка в рабочем разведении в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) и инкубировали 16–18 ч при 4 °С. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл блокирующего раствора (ФБР, 10%-е обезжиренное молоко, рН 7,4) и инкубировали 1 ч при 37 °С. После отмывания планшетов раствором ФБС-Т тестируемые сыворотки, разведенные 1:80 в блокирующем буфере (ФБР, 3%-е обезжиренное молоко, рН 7,4), вносили в объеме 100 мкл в лунку и инкубировали в термостатируемом шейкере 1 ч при 37 °С. Повторяли отмывку планшетов, вносили конъюгат в рабочем разведении и инкубировали в тех же условиях. После отмывки вносили субстрат АВТС, через 10–15 мин останавливали реакцию добавлением 1%-го раствора додецилсульфата натрия и учитывали результаты реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

Оценка сходимости результатов реакции. Для оценки сходимости результатов реакции положительную сыворотку крови свиней в рабочем разведении вносили в лунки планшета и после проведения реакции измеряли ОП в каждой лунке. Коэффициент вариации рассчитывали по формуле

$$C = (\delta/\bar{x}) \times 100\%,$$

где δ – среднее квадратичное отклонение;
 $\bar{x}$ – среднее арифметическое.

При исследовании положительной сыворотки на одном планшете коэффициент вариации составил 8,6%, что указывает на хорошую сходимость реакции (табл. 3).

Определение аналитической специфичности реакции. Для определения аналитической специфичности исследовали 10 гетерологичных сывороток крови свиней, содержащих антитела против вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней, вируса классической чумы свиней, цирковируса свиней 2-го типа, вируса болезни Ауески. Активность антигена с гетерологичными сыворотками не превышала фонового уровня, полученного в реакции с неиммунной сывороткой.

Определение позитивно-негативного порога реакции (ПНП). Исследовали 92 заведомо отрицательные сыворотки крови свиней. ПНП определяли, вычисляя средние значения ОП отрицательных сывороток и прибавляя три значения среднего квадратичного отклонения. Среднее значение ОП отрицательных сывороток с утроенным значением среднего квадратичного отклонения составило 0,392. Граница ПНП при исследовании сывороток крови свиней соответствовала процен-

Таблица 2
Значения коэффициента корреляции для различных разведений сывороток

Разведение	Коэффициент корреляции
1:20	0,80186
1:40	0,82486
1:80	0,87514
1:160	0,81618

ту позитивности (ПП), равному 30. Сыворотки свиней с ПП < 30% считались отрицательными, с ПП ≥ 30% – положительными.

Определение диагностической специфичности реакции. Диагностическую специфичность ЗАВ-ИФА определяли путем тестирования 100 заведомо отрицательных сывороток крови свиней, завезенных в РФ из Норвегии. При этом не было получено ни одного ложноположительного результата. Таким образом, на данной панели сывороток специфичность реакции составляла 100%.

Определение диагностической чувствительности реакции. Для оценки диагностической чувствительности ЗАВ-ИФА использовали сыворотки крови свиней, экспериментально инфицированных вирусом ящура: 4 головы были заражены вирусом типа А, 11 – типа О, 4 – типа Азия-1. Кровь отбиралась до заражения, а также с 6-го по 12-й день после инфицирования (ДПИ).

Все сыворотки, отобранные до заражения, были серонегативными в ЗАВ-ИФА. Антитела к вирусу ящура были обнаружены в 7 из 18 сывороток на 6-й ДПИ, в 13 из 19 – на 7-й ДПИ, в 16 из 19 – на 8-й ДПИ и во всех 76 сыворотках, отобранных на 9–12-й ДПИ (табл. 4).

Сыворотки, отобранные на 6–8-й ДПИ, были включены в панель для оценки способности метода выявлять антитела на ранних сроках после заражения как косвенного показателя аналитической чувствительности. При определении диагностической чувствительности

График зависимости $\lg$ титра антител в ИФА от $\lg S/P$, определенного в рабочем разведении сывороток 1:80

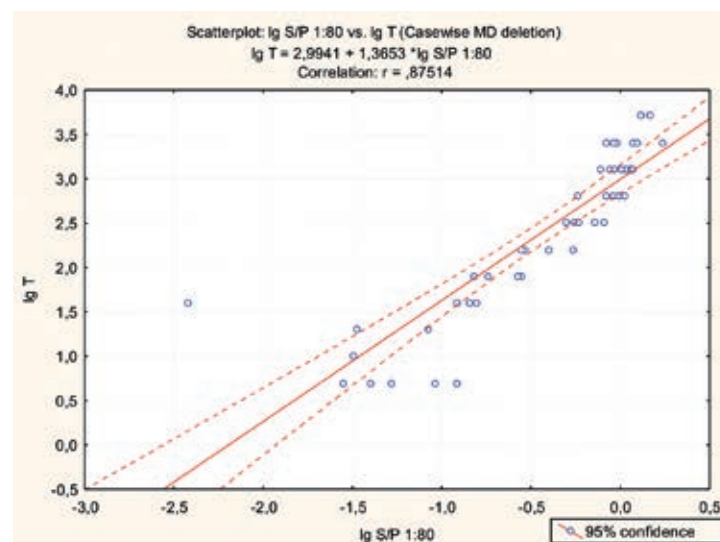


Таблица 3
Оценка сходимости ЗАВ-ИФА

Характеристика сыворотки	Минимальное значение ОП ($x_{\min}$)	Максимальное значение ОП ($x_{\max}$)	Среднее значение ОП ($\bar{x}$)	Среднее квадратичное отклонение (δ)	Коэффициент вариации (c), %
Положительная сыворотка	0,881	1,239	1,019	0,088	8,6

Таблица 4
Результаты исследований в ЗАВ-ИФА сывороток крови свиней, экспериментально зараженных вирусом ящура

Дни после инфицирования	Результаты ЗАВ-ИФА (положительных/исследовано)			
	тип А	тип О	тип Азия-1	Всего
0	0/4	0/11	0/4	0/19
6	2/4	4/10	1/4	7/18
7	3/4	6/11	4/4	13/19
8	4/4	8/11	4/4	16/19
9	4/4	11/11	4/4	19/19
10	4/4	11/11	4/4	19/19
11	4/4	11/11	4/4	19/19
12	4/4	11/11	4/4	19/19

такие «ранние» сыворотки не учитываются. Поскольку все сыворотки, отобранные на 9–12-й ДПИ, показали в ЗАВ-ИФА положительный результат, можно утверждать, что диагностическая чувствительность метода в условиях экспериментального заражения свиней составляет 100%.

Оценка реакции при проведении рутинных диагностических исследований. Согласно международным требованиям валидация диагностического метода не должна ограничиваться серией экспериментов, оценка метода проводится все время, пока он применяется в исследованиях.

В 2014–2017 гг. ЗАВ-ИФА применялась для исследований полевых сывороток крови свиней, полученных из хозяйств РФ. При проведении этих исследований применялась та же схема, что и при исследовании сывороток крови от КРС и МРС [2]. Сначала пробы исследовали методом ЗАВ-ИФА, служившим скрининговой тест-системой. Затем все сыворотки, показавшие положительный результат, дополнительно тестировали в подтверждающей тест-системе PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария).

В 2014 г. в Приморском крае РФ было зарегистрировано несколько вспышек ящура типа О у свиней [1]. Для подтверждения диагноза на ящур из одного хозяйства в ФГБУ «ВНИИЗЖ» помимо афтозного материала поступили сыворотки крови свиней. С помощью ЗАВ-ИФА в пробах обнаружены антитела к неструктурным белкам вируса ящура, в подтверждающей тест-системе эти пробы также были положительными. Таким образом, серологические методы подтвердили факт переболевания ящуром свиней в данном хозяйстве.

В период с 2015 по 2017 г. на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура было исследовано 4833 сыворотки крови свиней из различных регио-

нов РФ, благополучных по ящуру. В ЗАВ-ИФА 4802 пробы показали отрицательный результат, а 31 проба – положительный результат. При перепроверке в тест-системе PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Швейцария) положительные результаты не подтвердились и, следовательно, были интерпретированы как ложные. Таким образом, при проведении рутинных исследований диагностическая специфичность ЗАВ-ИФА составляла 99,4%. Этот показатель близок к значению диагностической специфичности, установленному на этапе разработки метода (100%).

Таким образом, в процессе рутинных диагностических исследований подтвердились характеристики ЗАВ-ИФА (высокая чувствительность и специфичность), установленные на этапе разработки метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови свиней разработана тест-система ЗАВ-ИФА. Валидация показала, что ЗАВ-ИФА способна с высокой специфичностью и чувствительностью выявлять антитела к вирусу ящура в сыворотке крови инфицированных животных. Результаты рутинных диагностических исследований подтвердили высокую специфичность и чувствительность ЗАВ-ИФА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мищенко А. В., Мищенко В. А., Караулов А. К. Ящур свиней в Приморском крае // Ветеринария. – 2015. – № 8. – С. 15–17.
2. Разработка и валидация тест-системы ЗАВ-ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота / А. С. Яковлева, А. В. Каньшина, А. В. Щербаков, Е. С. Орлова // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 4 (15). – С. 36–42.
3. Рекомбинантные неструктурные белки ЗА, ЗВ и ЗАВ вируса ящура: использование для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота / А. С. Яковлева, А. В. Щербаков, А. В. Каньшина [и др.] // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 165–171.
4. Решение об устанавлении статусов регионов Российской Федерации по заразным болезням животных и условиях перемещения подконтрольных Госветнадзору товаров. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/regional> (дата обращения: 13.03.18).
5. An overview on ELISA techniques for FMD / L. N. Ma, J. Zhang, H. T. Chen [et al.] // Virol. J. – 2011. – Vol. 8:419. – URL: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-419> (дата обращения: 13.03.18).
6. Foot-and-mouth disease. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/animal_health_in_the_world/docs/pdf/disease_cards/foot_and_mouth_disease.pdf (дата обращения: 13.03.18).
7. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases // Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals / OIE. – 2018. – Chap. 1.1.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (дата обращения: 15.03.18).

Поступила 20.04.18
Принята в печать 10.08.18

INDIRECT ELISA FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO FMDV NON-STRUCTURAL PROTEINS IN PORCINE SERA

A. S. Yakovleva¹, A. V. Kanshina², A. V. Scherbakov³

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

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

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

SUMMARY

An indirect variant of ELISA used for detection of antibodies to nonstructural proteins of the FMD virus in porcine blood sera was developed. The results of the validation showed that the developed method is characterized by high sensitivity, specificity and reproducibility. When testing the blood serum panel obtained from experimentally infected animals, the method allowed to detect antibodies to FMD virus in 7 of 18 sera collected on day 6 post inoculation, in 13 of 19 sera – on day 7 post inoculation, in 16 of 19 sera – on day 8 post inoculation and in all 76 sera obtained on days 9–12 post inoculation. The diagnostic specificity of 3AB-ELISA was 100% when testing 100 knowingly negative blood sera from pigs imported to Russia from Norway. High specificity and sensitivity of the method, established during the development of the method, are confirmed in the course of routine diagnostic tests.

Key words: FMD virus, non-structural proteins, ELISA test.

INTRODUCTION

Foot-and-mouth disease is a highly contagious viral disease affecting domestic and wild cloven-hooved animals including pigs. The disease is classified to transboundary diseases capable of causing epidemics and high economic losses to animal farming.

The FMD agent is non-enveloped RNA virus belonging to *Aphthovirus* genus of *Picornaviridae* family. There are seven virus serotypes: O, A, C, Asia-1, SAT-1, SAT-2 and SAT-3. Many genetic and antigenic virus variants exist within each virus serotype.

FMD is not endemic in the Russian Federation. There is, however, a permanent threat of the disease introduction from Asian countries primarily from China. Therefore, a strategy for FMD prevention and control aimed at prevention the disease occurrence and spread in the country's territory is in place in the Russian Federation. Buffer zone where cattle and small ruminants are vaccinated against FMD has been established in the areas at high risk of the infection introduction and spread. Methods allowing detection of antibodies to FMDV non-structural proteins in animal blood are used to detect infected animals among vaccinated ones. Such antibodies are detected in infected animals but not detected in vaccinated ones when purified vaccines complying the World Organization for Animal Health (OIE) requirements are applied [5, 6].

Earlier, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to FMDV non-structural proteins in cattle and small ruminant sera was developed and validated by the FGBI "ARRIAH" [2]. This method (3AB-ELISA) has been successfully used for diagnostic and monitoring tests for several years.

Rules for FMD regionalization of the Russian Federation territory came into force in 2017. According to the said rules, animals can be moved out of the zone where anti-FMD vaccination is carried out to the zone without vaccination providing that they lack post-infection serum antibodies to FMDV. Thus, tests of animals for their FMD infection status became obligatory for commercial operations involving animal movements [4].

Since this rule is also compulsory for pigs a test for anti-FMDV antibodies in animal sera has become in-demand for pig farms.

Goal of the study is to develop and to validate 3AB-ELISA intended for detection of antibodies to FMDV non-structural antibodies in porcine sera.

MATERIALS AND METHODS

Antigen. 3AB recombinant protein, derived by expression in *E. coli* was used as an antigen. Expression and purification conditions are described earlier [3].

Table 1
Effect of blocking solution formulation on mean OD values of control sera
n = 4

Blocking solution	Values for antigen-containing wells			Values for antigen-free wells	
	OD, CS+	OD, CS-	S/N	OD, CS+	OD, CS-
Milk concentration:					
1%	1.19 ± 0.09	0.21 ± 0.01	5.63 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
3%	1.09 ± 0.08	0.16 ± 0.01	6.90 ± 0.07	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
10%	1.00 ± 0.08	0.15 ± 0.01	6.55 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Bovine serum albumin concentration:					
1%	1.42 ± 0.09	0.35 ± 0.01	4.04 ± 0.08	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01
3%	1.31 ± 0.05	0.38 ± 0.02	3.44 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01
10%	1.29 ± 0.09	0.34 ± 0.01	3.79 ± 0.07	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Normal equine serum concentration:					
1%	0.98 ± 0.08	0.24 ± 0.01	4.14 ± 0.08	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
3%	1.22 ± 0.04	0.29 ± 0.01	4.17 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
10%	0.96 ± 0.05	0.19 ± 0.01	5.00 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Animal sera. Reference serum derived from a pig experimentally infected with type A FMD virus was used as positive control; serum from pig lacking antibodies against FMD virus was used as negative control. The said sera were ELISA tested for antibodies to FMDV non-structural proteins with PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Switzerland).

Sera from pigs with known infection status were used for determination of working serum dilutions, cut-off value, diagnostic sensitivity and susceptibility of the assay. One hundred and thirty-two sera collected from experimentally FMDV-infected pigs on day 6–12 after infection were used as known positive samples. The said samples were provided by staff-members of the Reference Laboratory for FMD Diagnosis. Sera from pigs imported from Norway to the Russian Federation were used as known negative samples.

Anti-species antibody conjugate. Commercial anti-porcine IgG antibody peroxidase conjugate (Sigma) was used.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 3AB-ELISA development was the subject of the study and described in Results and Discussion. ELISA using PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Switzerland) was carried out in accordance with its manufacturer's instruction.

Statistical processing of ELISA results was performed in accordance with the OIE recommendations [7].

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of reagents and assay procedure. Working dilutions of antigen and anti-species conjugate, op-

timal formulation of blocking solution, temperature and time periods for each ELISA stage as well as admissible optical density (OD) values of control sera were determined.

Working antigen and anti-species conjugate dilutions were determined with chessboard titration using positive and negative sera. The antigen and conjugate dilutions giving the following OD values of positive control serum and negative control serum were used as working dilutions: 1.0–1.1, and 0.08–0.19, respectively. Working antigen dilution was 2 µg/ml and working anti-porcine IgG conjugate dilution was 1:20,000.

Tests of 1%, 3% and 10% skimmed milk and 10% equine serum based on TBS buffer containing 0.01% Twin-20 were performed to select blocking solution. The 3% and 10% skimmed milk was found to be the most optimal as a component of blocking buffer and for dilution of samples (Table 1).

Forty-seven porcine sera with different antibody levels were tested by serial dilution method at four different dilutions: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 to determine optimal working serum dilution. S/P ratio was determined for each serum dilution:

$$S/P \text{ ratio} = (OD - NC_x)/(PC_x - NC_x),$$

where OD – mean optical density of tested serum;
NC_x – mean OD of negative control serum;
PC_x – mean OD of positive control serum.

Then, lg S/P and lg T were calculated for each dilution. The obtained data were processed using Statistica computer programme. At the end, correlation coefficient was determined (Table 2).

Table 2 shows that the highest correlation coefficient, R = 0.87, when standard error was the lowest, 0.66646, was estimated when the sera were diluted at 1:80. Therefore, the said dilution was selected as a working one.

Linear regression equation for 1:80 serum dilution was as follows:

$$\lg T = 2.9941 + 1.3653 \times \lg S/P,$$

where 2.9941 and 1.3653 – A and B coefficients, respectively.

Table 2
Correlation coefficient for different serum dilutions

Dilution	Correlation coefficient
1:20	0.80186
1:40	0.82486
1:80	0.87514
1:160	0.81618

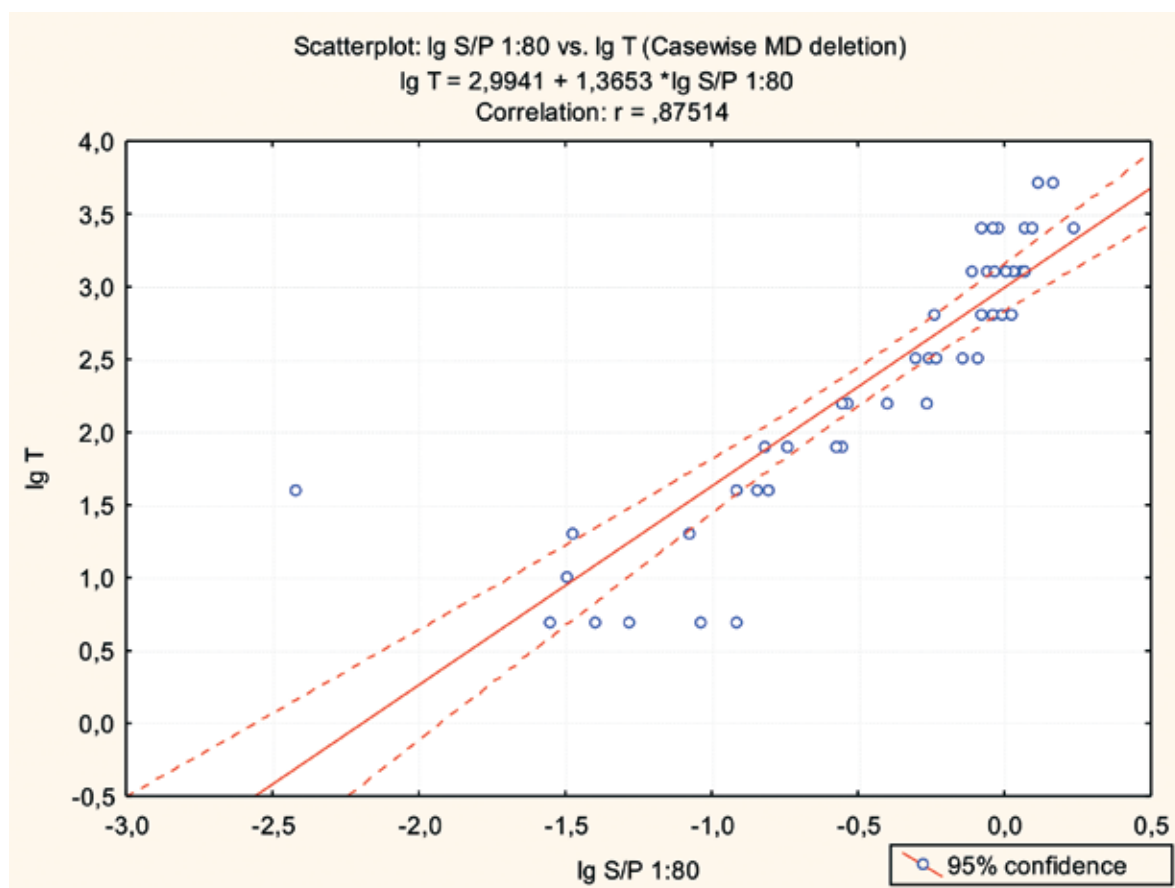


Fig. Diagram of Ig ELISA antibody titre dependence from lg S/P determined in 1:80 working serum dilution

Scatterplot of lg S/P versus lg T for 1:80 working serum dilution is given in Figure.

The following 3FD-ELISA procedure was established based on the results of all parameters' optimization. Recombinant protein (100 µl) at its working dilution made with 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) was added to each well of the plate and the plate was incubated for 16–18 hours at 4 °C. Then, 100 µl of blocking solution (PBS, 10% skimmed milk, pH 7.4) were added to the plate wells and the plate was incubated for 1 hour at 37 °C. After the plate washing with PBS-T tested sera diluted 1:80 with blocking buffer (PBS, 3% skimmed milk, pH 7.4) were added to wells (100 µl per well) and the plates were incubated in temperature-controlled shaker at 37 °C for one hour. The plates were washed and the conjugate at its working dilution was added, the plates were incubated under the same conditions. ABTS substrate was added after washing and the reaction was stopped by adding 1% sodium dodecyl sulphate solution in 10–15 minutes; the results were recorded with spectrophotometer at wavelength of 405 nm.

Assessment of the reaction result repeatability. To test the reaction results for their repeatability positive por-

cine serum at its working dilution was added to the plate wells and OD value was measured in each well. Coefficient of variation was calculated according to the following formula:

$$C = (\delta/\bar{x}) \times 100\%,$$

where δ – standard deviation;
 $\bar{x}$ – arithmetical mean.

Coefficient of variation was 8.6% when positive sera were tested on one plate that was indicative of good repeatability (Table 3).

Determination of 3AB-ELISA analytical specificity. To determine analytical specificity 10 heterologous porcine sera containing antibodies against porcine reproductive respiratory syndrome virus, classical swine fever virus, porcine circovirus type 2, Aujeszky's disease virus were tested. Antigen activity when it reacted with heterologous sera was not higher than background level induced when it reacted with non-immune serum.

Determination of cut-off value for 3AB-ELISA. A total of 92 known negative porcine sera were tested. Cut-off value was determined by calculation of mean OD for negative sera plus three standard deviation. Mean negative

Table 3
Test of 3AB-ELISA for repeatability

Serum characteristics	Minimal OD value ($x_{\min}$)	Maximum OD value ($x_{\max}$)	Mean OD value ($\bar{x}$)	Standard deviation (δ)	Coefficient of variation (c),%
Positive serum	0.881	1.239	1.019	0.088	8.6

Table 4
Results of 3AB-ELISA tests of sera collected from pigs experimentally infected with FMD virus

Days after infection	3AB-ELISA results (positive/tested)			
	type A	type O	type Asia-1	Total
0	0/4	0/11	0/4	0/19
6	2/4	4/10	1/4	7/18
7	3/4	6/11	4/4	13/19
8	4/4	8/11	4/4	16/19
9	4/4	11/11	4/4	19/19
10	4/4	11/11	4/4	19/19
11	4/4	11/11	4/4	19/19
12	4/4	11/11	4/4	19/19

serum OD value with three standard deviation was 0.392. When porcine sera were tested, cut-off value corresponded to percentage of positives (PP) equal to 30%. Porcine sera with PP < 30% were considered negative, porcine sera with PP ≥ 30% – positive.

Determination of 3AB-ELISA diagnostic specificity. 3AB-ELISA diagnostic specificity was determined by testing 100 known negative sera collected from pigs imported to the RF from Norway. No false-positive results were obtained. Thus, 3AB-ELISA specificity was 100% when the said panel of sera was tested.

Determination of the 3AB-ELISA diagnostic sensitivity. To test 3AB-ELISA for its diagnostic sensitivity sera from pigs experimentally infected with FMD virus were used: four pigs were infected with type A FMD virus, 11 pigs were infected with type O FMDV, 4 pigs were infected with type Asia-1 FMDV. Blood samples were collected before infection and on day 6–12 after infection.

All sera collected before infection were seronegative when tested with 3AB-ELISA. Anti-FMDV antibodies were detected in 7 out of 18 sera on day 6 after infection, in 13 out of 19 sera – on day 7 after infection, in 16 out of 19 sera – on day 8 after infection and in all 76 sera collected on day 9–12 after infection (Table 4).

Sera collected on day 6–8 after infection were included in the panel for testing the method for its ability to detect antibodies at early stage after infection as a proxy of its analytical sensitivity. Such “early” sera are not taken into account when diagnostic sensitivity was determined. It could be argued that diagnostic sensitivity of the method was 100% when sera from experimentally infected pigs were used since all sera collected on day 9–12 after infection were tested positive with 3AB-ELISA.

Assessment of 3AB-ELISA for its use in routine diagnostic testing. According to the international requirements, validation of a diagnostic method should not be limited to a series of experiments; it should be performed continuously as long as it is used during tests.

In 2014–2017 3AB-ELISA was used for testing field porcine sera submitted from the RF farms. The scheme used for these tests was the same as that one used for tests of sera from cattle and small ruminants [2]. At first, samples were tested with 3AB-ELISA served as a screening test-system. Then, all sera tested positive

were additionally examined with PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA used as a confirmation test-system (Prionics, Switzerland).

Several type O FMD outbreaks were reported in pigs in the Primorsky Krai, Russian Federation, in 2014 [1]. Besides aphthae materials, porcine sera were submitted to the FGBI “ARRIAH” from one farm for FMD diagnosis confirmation. Antibodies to FMDV non-structural proteins were detected when the samples were tested with 3AB-ELISA. The same samples were also tested positive when they were examined with the confirmation test-system. Thus, the serological methods confirmed that pigs had been affected with FMD on this farm.

In 2015–2017, 4,833 porcine sera from various FMD-free RF regions were tested for antibodies to FMDV non-structural proteins: 4,802 samples were tested negative with 3AB-ELISA and 31 samples were tested positive with 3AB-ELISA. Positive results were not confirmed when the said samples were retested with PrioCHECK FMDV NS FMDV antibody test kit, ELISA (Prionics, Switzerland) and consequently they were interpreted as false-positives. Thus, diagnostic specificity of 3AB-ELISA used for routine testing was 99.4%. It is close to the diagnostic specificity (100%) determined at the stage of the method development.

Thus, 3AB-ELISA characteristics (high sensitivity and specificity) determined at the stage of the method development were confirmed during routine diagnostic testing.

CONCLUSION

3AB-ELISA for the detection of antibodies to FMDV non-structural proteins in porcine sera was developed. Its validation has showed that 3AB-ELISA is capable of detecting antibodies to FMD virus in sera of infected animals with high specificity and sensitivity. 3AB-ELISA high specificity and sensitivity were confirmed by routine diagnostic test results.

REFERENCES

1. Mischenko A. V., Mischenko V. A., Karaulov A. K. Porcine FMD in the Primorsky Krai. *Veterinariya*. 2015; 8: 15–17 (in Russian).
2. Development and validation of 3AB-ELISA for the detection of antibodies to non-structural proteins of FMD virus in sera from cattle and small ruminants. A. S. Yakovleva, A. V. Kanshina, A. V. Shcherbakov, Ye. S. Orlova. *Veterinary Science Today*. 2015; 4 (15): 36–42 (in Russian).
3. Recombinant FMDV non-structural proteins 3A, 3B and 3AB: use for differentiation of vaccinated and infected cattle / A. S. Yakovleva, A. V. Shcherbakov, A. V. Kanshina [et al.]. *Molecular Biology*. 2006; 40 (1): 165–171 (in Russian).
4. Decision on establishing statuses of the Russian Federation regions with regard to contagious animal diseases as well as conditions of movement of regulated goods. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/regional> (reference date: 13.03.18) (in Russian).
5. An overview on ELISA techniques for FMD. L. N. Ma, J. Zhang, H. T. Chen [et al.]. *Virol. J.* 2011; 8:419. URL: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-419> (reference date: 13.03.18).
6. Foot-and-mouth disease. URL: http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/animal_health_in_the_world/docs/pdf/disease_cards/foot_and_mouth_disease.pdf (reference date: 13.03.18).
7. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infection disease. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. OIE. 2018. Chap. 1.1.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (reference date: 15.03.18).

Submitted on 20.04.18

Approved for publication on 10.08.18

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ДНК ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ПРОВЕДЕННЫХ В 2017 Г.

Д. Н. Федосеева¹, Е. В. Аронова², А. А. Варенцова³, А. А. Елсукова⁴, Али Мазлум⁵, Д. В. Шарыпова⁶, Н. Н. Власова⁷, А. С. Иголкин⁸

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

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

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

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

⁵ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ali.mazloun6@gmail.com

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

⁷ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁸ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты исследований биоматериала от домашних свиней и диких кабанов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по обнаружению генома вируса африканской чумы свиней, проведенных на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (г. Владимир). В 2017 г. в рамках государственного лабораторного мониторинга исследовано 8500 проб, поступивших из 44 субъектов Российской Федерации, среди которых выявлены 504 пробы, содержащие геном вируса африканской чумы свиней. В 2017 г. впервые зарегистрировано возникновение очагов инфекции в Уральском и Сибирском федеральных округах РФ. Проведенные исследования и сохраняющиеся длительное время неблагополучие по африканской чуме свиней территорий РФ подтвердили актуальность дальнейшего надзора в популяциях восприимчивых животных. Разработка, организация и выполнение программы надзора распространения заболевания в дикой фауне остается первоочередной задачей. Для своевременного купирования очагов инфекции на уровне регионов требуются составление и реализация графиков отбора проб с равномерным распределением по времени отбора биоматериала и направления отобранных образцов в исследовательские лаборатории.

Ключевые слова: африканская чума свиней, мониторинговые исследования, геном, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

UDC 619:578.842.1:616-076

ANALYSIS OF MONITORING STUDIES ON AFRICAN SWINE FEVER VIRUS DNA DETECTION CARRIED OUT IN 2017

D. N. Fedoseyeva¹, Ye. V. Aronova², A. A. Varentsova³, A. A. Yelsukova⁴, Ali Mazloun⁵, D. V. Sharypova⁶, N. N. Vlasova⁷, A. S. Igolkin⁸

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

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

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

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

⁵ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ali.mazloun6@gmail.com

⁶ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sharipova@arriah.ru

⁷ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁸ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

SUMMARY

The paper describes the results of testing of biomaterial from domestic pigs and wild boars by real-time PCR used for African swine fever virus genome detection, carried out in the FGBI "Federal Centre for Animal Health" (Vladimir). In 2017 8,500 samples from 44 subjects of the Russian Federation were tested within the framework of the state laboratory monitoring. African swine fever virus genome was detected in 504 samples. In 2017 ASF outbreaks were registered in the Urals and Siberian Federal Districts of the RF for the first time. The conducted research and persistent ASF infection in the territory of the RF have demonstrated the need for further surveillance in the populations of susceptible animals. Development, organization and implementation of the program for ASF spread surveillance in wild fauna remains a high priority. It is necessary to create and implement sampling schedules with uniform sampling of biomaterial and submission of the collected samples to the research laboratories for timely ASF outbreak containment at the regional level.

Key words: African swine fever, monitoring studies, genome, real-time polymerase chain reaction.

ВВЕДЕНИЕ

Продовольственная безопасность Российской Федерации является одним из главных направлений обеспечения национальной безопасности страны в среднесрочной перспективе [4]. В рамках реализации данного направления предусмотрен комплекс мероприятий по развитию отраслей животноводства. В их число входит улучшение эпизоотической ситуации по особо опасным болезням животных, в том числе по африканской чуме свиней (АЧС) [3].

Предотвращение распространения инфекции и оздоровление территории страны напрямую зависят от эффективности реализуемой системы надзора [1].

Основными целями системы надзора являются:

- 1) доказательство отсутствия или выявления присутствия болезни/инфекции;
- 2) установление тенденции развития болезни в восприимчивых популяциях;
- 3) раннее выявление экзотических и эмерджентных болезней [12].

С начала эпизоотии АЧС в 2007 г. и по 2018 г. на территории РФ было зарегистрировано 1274 вспышки АЧС, из которых более 50% зафиксировали в популяции домашних свиней из небольших хозяйств (ЛПХ, КФХ, ИП) [9]. До 2011 г. очаги инфекции в основном отмечали на территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, где возникла первичная эндемичная по АЧС зона «юг». В 2012–2013 гг. болезнь регистрировали как в Южном, так и в Центральном федеральном округе, где в результате образовалась вторая эндемичная по АЧС зона – «север».

В дальнейшем тенденция распространения инфекции с вовлечением в эпизоотический процесс новых территорий сохранилась [9]. Так, с 2015 г. начался очередной этап эпизоотии АЧС – нарастание третьей волны эпизоотического процесса, – сопровождающийся значительным увеличением числа очагов болезни и вовлечением значительного количества новых регионов. В итоге за 10 лет неблагополучия АЧС охватила 43 региона европейской части РФ [8].

На сегодняшний день риск дальнейшего распространения инфекции остается высоким, что связано со следующими факторами: 1) случаи межхозяйственной поставки живых животных (свиней) и продукции свиноводства из инфицированных зон в свободные от АЧС территории при условии задержек действий в цепи «диагноз – карантин»; 2) частичное или полное отсутствие мер биобезопасности в небольших хозяйствах (ЛПХ, КФХ, ИП) ввиду финансовой несостоятельности или непонимания, их уклонение от мероприятий надзора; 3) отсутствие действующих превентивных программ на территории ряда субъектов РФ; 4) перемещение живых животных и свиноводческой продукции без ветеринарных сопроводительных документов (ВСД); 5) диффузное распространение инфекции как внутри неблагополучного региона, так и за его пределы путем миграции дикого кабана (внутрирегиональный фактор) [8].

Важным звеном в мероприятиях надзора остается оперативное проведение лабораторных исследований проб биологического материала (патологического материала и сывороток крови) для выявления вируса АЧС или наличия его генетического материала, а также антител к возбудителю лабораториями (испытательными центрами), входящими в систему органов и учреждений государственной ветеринарной службы РФ, или

лабораториями (испытательными центрами), аккредитованными в национальной системе аккредитации [2].

В настоящее время практика лабораторных исследований указывает, что по результативности полимеразная цепная реакция остается методом «первого выбора» для диагностики АЧС [1].

Целью работы был анализ результатов мониторинговых исследований по выявлению ДНК вируса АЧС, проведенных в референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом молекулярно-генетических исследований служили биологический материал от домашних свиней и диких кабанов и пробы изделий свиного происхождения, поступившие в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из различных регионов РФ в течение 2017 г.

Выделение суммарной ДНК осуществляли методом нуклеосорбции с помощью коммерческого комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио», г. Москва).

Постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с применением коммерческой тест-системы «АЧС» для выявления вируса АЧС методом ПЦР-РВ (ФБУН ЦНИИЗ Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителей [5, 6].

Постановку ПЦР-РВ осуществляли в амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Германия). Учет результатов реакции проводили, анализируя кривые накопления флуоресцентного сигнала для каждой пробы с помощью программного обеспечения прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с приказом Россельхознадзора от 30 декабря 2016 г. № 1004 (с учетом доп. и изм. 2017 г.) «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО на 2017 год» (<http://www.refcenter57.ru/files/1004.pdf>) сотрудниками референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» проведены исследования проб биологического материала от домашних свиней и диких кабанов, а также изделий свиного происхождения.

В 2017 г. исследовано 8500 проб (патологический материал, кровь и сыворотка от домашних свиней и диких кабанов, изделия свиного происхождения) из 44 субъектов РФ (табл. 1). Исследования проводили как в рамках активного мониторинга, так и с целью подтверждения диагноза АЧС, поставленного региональными ветеринарными лабораториями и подведомственными Россельхознадзору межрегиональными ветеринарными лабораториями субъектов РФ.

В связи с напряженной эпизоотической ситуацией наибольшее количество проб для исследования направлено из Республики Крым (914 проб) и Владимирской области (778 проб). Наименьшее количество проб поступило из Республики Дагестан, Нижегородской и Тюменской областей (табл. 1).

Пик поступления проб пришелся на сентябрь и декабрь 2017 г. – 1411 и 1884 пробы соответственно, что в первую очередь связано с необходимостью завершения запланированных на год противоэпизоотических

Таблица 1

Распределение по регионам РФ проб, поступивших для исследования в референтную лабораторию по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г.

№ п/п	Регион РФ	Кол-во проб, шт.		№ п/п	Регион РФ	Кол-во проб, шт.	
		общее	из них положительных			общее	из них положительных
1	Архангельская обл.	92	0	23	Новгородская обл.	199	0
2	Астраханская обл.	92	0	24	Омская обл.	106	97 (91,51%)
3	Белгородская обл.	212	0	25	Оренбургская обл.	100	0
4	Брянская обл.	100	0	26	Орловская обл.	91	12 (13,19%)
5	Владимирская обл.	778	52 (6,68%)	27	Пензенская обл.	200	0
6	Волгоградская обл.	206	2 (0,97%)	28	Псковская обл.	100	0
7	Вологодская обл.	750	0	29	Ростовская обл.	84	4 (4,76%)
8	Воронежская обл.	200	0	30	Рязанская обл.	185	0
9	Забайкальский край	69	0	31	Самарская обл.	95	0
10	Ивановская обл.	472	0	32	Смоленская обл.	100	0
11	Иркутская обл.	11	5 (45,46%)	33	Ставропольский край	195	0
12	Калининградская обл.	512	7 (1,37%)	34	Тверская обл.	100	0
13	Калужская обл.	200	0	35	Тульская обл.	100	0
14	Кировская обл.	223	0	36	Тюменская обл.	8	8 (100,00%)
15	Костромская обл.	313	0	37	Челябинская обл.	17	11 (64,71%)
16	Краснодарский край	88	35 (39,77%)	38	Ярославская обл.	103	0
17	Курганская обл.	21	3 (14,29%)	39	Респ. Башкортостан	300	0
18	Курская обл.	100	0	40	Респ. Дагестан	9	0
19	Ленинградская обл.	60	0	41	Респ. Крым	914	262 (28,67%)
20	Липецкая обл.	200	0	42	Респ. Мордовия	304	0
21	Московская обл.	70	0	43	Удмуртская Респ.	200	0
22	Нижегородская обл.	6	6 (100,00%)	44	Чувашская Респ.	205	0

мероприятий в регионах. На увеличение количества проб в II–IV кварталах отчетного периода, вероятно, также влияли: 1) природный фактор, обуславливающий рост заболеваемости АЧС в связи с биологическими особенностями животных (увеличение внутри- и межпопуляционных контактов в период гона, перегруппировки стад у диких кабанов и т. п.); 2) антропогенный фактор, также приводящий к росту вспышек в весенне-летний период (активное приобретение населением поросят для откорма, особенности содержания свиней в незащищенных хозяйствах (ЛПХ, КФХ) и др.) (рис. 1).

В результате проведенных исследований выявлено 504 пробы, содержащие ДНК вируса АЧС (5,93% от общего количества проб). Указанные пробы поступили из следующих субъектов РФ: Владимирской, Волгоградской, Иркутской, Калининградской, Курганской, Нижегородской, Омской, Орловской, Ростовской, Тюменской, Челябинской областей, Краснодарского края и Республики Крым (рис. 2). Учитывая данные по эпизоо-

Рис. 1. Распределение проб, поступивших для исследования, по месяцам 2017 г.

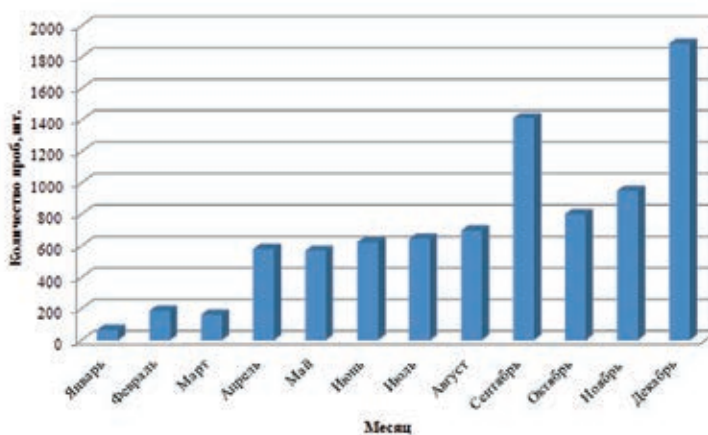




Рис. 2. Распределение по регионам проб, содержащих геном вируса АЧС

тической ситуации за предыдущие годы и полученные в представленной работе результаты, можно сделать вывод, что в трех регионах сохраняется длительное неблагополучие по АЧС: в Краснодарском крае вспышки регистрируют с 2008 г., в Ростовской области – с 2009 г. и в Волгоградской – с 2010 г. На территории Орловской области очаги инфекции ежегодно регистрируют с 2014 г. Первое сообщение об АЧС из Нижегородской области поступило в 2011 г. (выявлено два очага среди домашних свиней). Следующие четыре года регион сохранял благополучие по АЧС, но в 2016 г. произошел вторичный занос возбудителя инфекции. На территории Владимирской области вспышки болезни регистрировали в 2013, 2015 и 2016 гг. [11].

В 2017 г. АЧС впервые была зарегистрирована на территории Иркутской, Омской, Челябинской, Калининградской, Тюменской и Курганской областей и, согласно данным Россельхознадзора, в Ямало-Ненецком автономном округе и Красноярском крае [11]. Учитывая территориальную отдаленность регионов, входящих в состав Сибирского и Уральского федеральных округов, от ранее неблагополучных по АЧС субъектов РФ, можно предположить, что занос возбудителя АЧС на их территорию произошел с подконтрольными госветнадзору товарами [10].

Наибольший процент проб, в которых выявили геном вируса АЧС, пришелся на Тюменскую (100,00%), Нижегородскую (100,00%) и Омскую (91,51%) области (табл. 1).

Из 8500 проб, направленных на ПЦР-исследование, 110 составили пробы патологического материала от диких кабанов (1,18%), которые поступили из шести регионов Центрального, Южного и Северо-Западного федеральных округов РФ с высокой плотностью популяций данных животных (табл. 2). Согласно сопроводительным документам, пробы были отобраны от отстреленных животных и от трупов кабанов, найденных в лесных массивах.

В результате проведенных лабораторных исследований в 17 (15,50%) из 110 проб патологического материала от диких кабанов обнаружен геном вируса АЧС.

Согласно ранее опубликованным данным, доля неблагополучия по АЧС в дикой фауне составляет около 40% от общего числа вспышек [8]. Для признания страны благополучной по АЧС необходимы доказательства отсутствия циркуляции вируса в популяции восприимчивых животных (в том числе диких кабанов), основанные на результатах мониторинговых исследований [7].

В связи с этим дальнейший надзор за популяциями восприимчивых к АЧС животных (домашних свиней и диких кабанов) остается актуальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований, а также сохраняющееся длительное неблагополучие по АЧС территорий РФ указывают на необходимость продолжения мониторинговых исследований с использованием прямых методов диагностики (ПЦР). Поскольку основное количество проб биоматериала по государственному заданию поступает лишь к концу года, это может приводить к искажению реальной картины распространения болезни и задержке в принятии своевременных мер по купированию очагов инфекции. В связи с этим на уровне регионов требуются составление и своевременная реализация графиков отбора проб с равномерным распределением по времени отбора биоматериала и направления отобранных образцов в исследовательские лаборатории.

Результаты исследований позволили выявить 188 очагов АЧС как в новых, ранее благополучных регионах Сибирского и Уральского федеральных округов, так и в регионах, имеющих статус длительного неблагополучия по АЧС (Краснодарский край, Ростовская и Волгоградская области). Полученные данные коррелируют со сделанным ранее специалистами ИАЦ Управления ветнадзора прогнозом распространения АЧС в РФ [8].

Таблица 2
Результаты исследования проб патологического материала от диких кабанов с использованием ПЦР-РВ

№ п/п	Регион РФ	Общее количество проб, шт.	Количество проб, содержащих геном вируса АЧС, шт.
1	Белгородская обл.	2	2 (100%)
2	Брянская обл.	48	0
3	Владимирская обл.	13	1 (7,69%)
4	Волгоградская обл.	1	1 (100,00%)
5	Калининградская обл.	16	12 (75,00%)
6	Республика Крым	30	1 (3,33%)
Всего		110	17

Дикие кабаны являются дополнительной группой риска при АЧС, так как сохраняется возможность выноса возбудителя в незащищенные популяции домашних свиней. Следовательно, необходима разработка и выполнение программы надзора распространения заболевания в дикой фауне. Наличие инфицированных кабанов предопределяет необходимость систематического проведения мониторинговых исследований, охватывающих места обитания этих животных. Пристального внимания заслуживают ареалы, пересекающиеся с деятельностью человека, в том числе находящиеся в непосредственной близости к населенным пунктам, являющиеся излюбленным местом охоты, собирательства и отдыха людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ проведения лабораторных исследований по ряду вирусных болезней свиней на территории России в 2011–2017 гг. / А. А. Шевцов, О. Н. Петрова, С. Г. Ремыга [и др.] // *Ветеринария сегодня*. – 2018. – № 1. – С. 42–48.
2. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов африканской чумы свиней / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – М., 2016. – 16 с.
3. Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/70210644/paragraph/1188610:0>.
4. Доктрина продовольственной безопасности Российской Федерации: утв. Указом Президента Российской Федерации № 120 от 30.01.2010. – URL: <http://legalacts.ru/doc/ukaz-prezidenta-rf-ot-30012010-n-120/>.
5. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». – М.: ООО «НекстБио», 2012. – 14 с.
6. Инструкция по применению тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции. – М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017. – 24 с.
7. 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. – Гл. 15.1. – С. 751–756.
8. Прогноз до 2025 г. по распространению африканской чумы свиней в России / А. К. Караулов, А. А. Шевцов, О. Н. Петрова [и др.] // *Ветеринария и кормление*. – 2018. – № 3. – С. 12–14.
9. Прогноз по африканской чуме свиней в Российской Федерации на 2016 год / О. Н. Петрова, Ф. И. Коренной, Н. С. Бардина [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016. – 32 с.
10. Профилактика АЧС / Управление Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) по Новосибирской области. – URL: <http://rshn-nso.ru/proflaktika-achs>.
11. Текущая эпизоотическая ситуация по африканской чуме свиней. Хронология / Россельхознадзор. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/asf/chronology/>.
12. World Organisation for Animal Health (OIE). – URL: <http://www.oie.int>.

REFERENCES

1. Analysis of laboratory studies on a number of viral swine diseases in Russia in 2011–2017. A. A. Shevtsov, O. N. Petrova, S. G. Remyga [et al.]. *Veterinary Science Today*. 2018; 1: 42–48 (in Russian).
2. Veterinary rules of implementation of preventive, diagnostic, restrictive and other actions, imposition and lifting of the quarantine and other restrictions aimed at ASF spread prevention and ASF eradication. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. M.; 2016 (in Russian).
3. Agriculture development and regulation of agricultural production, raw materials and food markets program for 2013–2020. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/70210644/paragraph/1188610:0> (in Russian).
4. Decree of the President of the RF No. 120 dated January 30, 2010 "On adoption of the Doctrine of food security of the Russian Federation". URL: <http://legalacts.ru/doc/ukaz-prezidenta-rf-ot-30012010-n-120/> (in Russian).
5. Instruction on the use of reagents "AmpliPrime DNA-sorb-B kit" for DNA extraction from clinical material. M.: ООО "NextBio", 2012 (in Russian).
6. Instruction on the use of "ASF" test system for African swine fever virus detection using polymerase chain reaction. M.: FBUN TsNII for Epidemiology of the Rospotrebnadzor, 2017 (in Russian).
7. Terrestrial Animal Health Code. Vol. 2. Recommendations applicable to OIE Listed diseases of importance to international trade. OIE. 25th ed. Paris, France: OIE, 2016. Chap. 15.1: 751–756.
8. The forecast of African swine fever spread in Russia until 2025. A. K. Karaulov, A. A. Shevtsov, O. N. Petrova [et al.]. *Veterinariya i kormleniye*. 2018; 3: 12–14 (in Russian).
9. The forecast of African swine fever in Russia for 2016. O. N. Petrova, F. I. Korennoi, N. S. Bardina [et al.]. Vladimir: FGBI "ARRIAH", 2016 (in Russian).
10. ASF prevention. Territorial administration of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor) for Novosibirsk Oblast. URL: <http://rshn-nso.ru/proflaktika-achs> (in Russian).
11. ASF current epidemic situation. Chronology. Rosselkhoz nadzor. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/asf/chronology/> (in Russian).
12. World Organisation for Animal Health (OIE). URL: <http://www.oie.int>.

Поступила 25.07.18

Принята в печать 02.08.18

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ АКТИНОБАЦИЛЛЕЗНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ РЕШЕНИЯ

В. С. Русалеев

Ученый секретарь, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: rusaleev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Актинобациллезная плевропневмония — это инфекционное контагиозное заболевание свиней, возбудителем которого является бактерия *Actinobacillus pleuropneumoniae*. В настоящее время заболевание широко распространено во многих странах с развитым свиноводством. Болезнь наносит существенный экономический ущерб хозяйствам за счет большого падежа и затрат на лечение больных свиней и проведения ветеринарно-санитарных мероприятий. Ежегодное увеличение в мире случаев актинобациллезной плевропневмонии свиней, а также появление лекарственно-устойчивых форм актинобацилл диктуют необходимость более тщательного изучения и обсуждения данной проблемы. Основой эпизоотологического надзора за заболеванием является проведение постоянного мониторинга с целью выявления, подтверждения и регистрации актинобациллезной плевропневмонии свиней, ее характеристик и тенденций частоты развития и определения чувствительности к антимикробным препаратам ее возбудителя. В статье поднимается актуальная не только для ветеринарии, но и медицины тема применения антибиотиков и растущая стремительными темпами антибиотикорезистентность микроорганизмов. На модели возбудителя актинобациллезной плевропневмонии свиней рассмотрены причины появления антибиотикорезистентности и подробно обсуждены возможные подходы к преодолению устойчивости актинобацилл к антибиотикам и перспективам их применения, которые позволят справиться с этой проблемой. Большое значение для решения проблемы антибиотикорезистентности имеет целенаправленный надзор, ориентированный на мониторинг и сбор информации о назначении антибиотиков. Полученная в результате проведения мониторинга информация может служить основой для разработки плана и стратегии применения антибактериальных препаратов (выбор лекарственного средства, доза, пути введения, кратность, количество курсов), разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению актинобациллезной плевропневмонии свиней, сдерживанию появления и распространения антибиотикорезистентных бактерий.

Ключевые слова: актинобациллезная плевропневмония, антибиотикорезистентность, мониторинг.

UDC 619:616.98:579.843.96:578.74

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* IN SWINE: PROBLEMS AND SOLUTIONS

V. S. Rusaleyev

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

SUMMARY

Porcine pleuropneumonia is an infectious contagious disease caused by bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Currently, the disease is widespread in many countries with well-developed pig production. The disease causes significant economic damage to farms due to the large mortality and expenses for treatment of diseased pigs and implementation of veterinary and sanitary measures. Due to increased number of *Actinobacillus pleuropneumoniae* cases in pigs, and the emergence of actinobacillus-resistant forms, it is necessary to perform a more thorough study and discussion of this problem. The disease epidemic surveillance is based on continuous monitoring aimed at porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* identification, confirmation and registration, determination of its characteristics and trends in development of sensitivity to antimicrobial preparations. The article addresses the topic of antibiotic use and the antibiotic resistance of microorganisms, which is actual not only for veterinary medicine but also for medicine. The model of swine *Actinobacillus pleuropneumoniae* was used to study the reasons of antibiotic resistance. Possible approaches to overcoming the resistance of actinobacilli to antibiotics have been discussed. The prospects for the use of antibiotics were discussed in detail to cope with this problem. Targeted surveillance, aimed at monitoring and collecting information on the prescription of antibiotics is of great importance for the solution of the problem of antibiotic resistance. The information obtained from the monitoring can be used for development of the plan and strategy for the use of antibacterial preparations (preparation selection, dose, route of administration, frequency, number of courses), development and implementation of more effective approaches to the treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, control of the antibiotic-resistant bacteria occurrence and spread.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, antibiotic resistance, monitoring.

ВВЕДЕНИЕ

Актинобациллезная плевропневмония – инфекционное контактно-зоонозное заболевание свиней. Восприимчивы животные всех возрастов. Возбудителем болезни является бактерия *Actinobacillus pleuropneumoniae*, имеющая 15 сероваров и продуцирующая 4 типа токсинов [4, 5].

На сегодняшний день актинобациллезная плевропневмония широко распространена во многих странах с развитым свиноводством. Несмотря на высокую чувствительность возбудителя ко многим антибактериальным препаратам, лечение больных животных не всегда дает хорошие результаты. Эффективность антибиотикотерапии зачастую варьирует в различных хозяйствах.

Ежегодное увеличение в мире случаев актинобациллеза, а также появление и широкое распространение антибиотикорезистентных форм актинобацилл [2, 6], не чувствительных ко многим антибактериальным препаратам (АБП), сопровождается снижением эффективности терапии, увеличением сроков лечения и повышением летальности. Все это диктует необходимость мониторинга возбудителя, его структуры и уровня лекарственной устойчивости. Значимость проблемы показывает необходимость проведения анализа, оценки и прогноза состояния актинобациллезной плевропневмонии в свиноводческих хозяйствах Российской Федерации. Эмпирическая антибиотикотерапия болезни, практикуемая в настоящее время ветеринарными специалистами свиноводческих хозяйств, должна учитывать фактические данные эпизоотологического мониторинга антибиотикорезистентности *Actinobacillus pleuropneumoniae*, циркулирующих в конкретных хозяйствах.

В настоящее время в России отсутствует какая-либо система контроля за актинобациллезной плевропневмонией по той причине, что она не представляет опасности для человека и не относится к группе трансграничных инфекций, а является всего лишь экономически значимой болезнью свиней. По мнению многих ветеринарных специалистов, самым легким методом борьбы с резистентностью является поиск и разработка новых препаратов. Однако необходимо подчеркнуть, что этот путь трудный, дорогой и зачастую неэффективный. За 30 лет, начиная с 70-х гг. прошлого века, было открыто только несколько новых классов антибиотиков, и за это же время резистентность ряда возбудителей к отдельным антибиотикам полностью исключила возможность их применения в ветеринарии и медицине. Более того, сегодня подавляющее большинство крупных фармацевтических компаний прекратили разработку новых классов антимикробных препаратов, поскольку они не приносят ожидаемых результатов [3]. В связи с этим важно попытаться сохранить те препараты, которые имеются в распоряжении ветеринарных специалистов и которые пока оказывают терапевтическое действие.

Решение проблемы антибиотикорезистентности необходимо начинать с разработки стратегии по ее предотвращению и сдерживанию, которая должна включать в себя несколько направлений. Ключевыми из них являются: мероприятия, направленные на ограничение использования антибиотиков, проведение целенаправленного эпизоотологического надзора, соблюдение принципов изоляции больных животных, обучение ветеринарных специалистов и реализация программ административного контроля.

В наши дни науке известны два основных механизма распространения антибиотикорезистентности: посредством генетических детерминант резистентности с подвижными генетическими элементами и распространение клонов резистентных бактерий (мутантов). Широкое использование в ветеринарной практике различных АБП и появление новых механизмов антибиотикорезистентности у бактерий диктуют необходимость более тщательного изучения данной проблемы у *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Мониторинг резистентности актинобацилл к антимикробным препаратам представляет собой систематический постоянный процесс сбора и анализа информации для количественной оценки распространенности антибиотикорезистентности и ее динамики во времени.

Цель проведения мониторинга резистентности *Actinobacillus pleuropneumoniae* к АБП состоит в получении информации, необходимой для разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению актинобациллезной плевропневмонии свиней, сдерживанию появления и распространения антибиотикорезистентных актинобацилл на местном и региональном уровнях.

При мониторинге антибиотикорезистентности *Actinobacillus pleuropneumoniae* основное внимание следует уделять получению и анализу данных по заболеваемости и смертности от актинобациллезной плевропневмонии, вызванной резистентными штаммами актинобацилл.

Необходимо осознавать, что мониторинг сегодняшнего дня лишь констатирует уже свершившийся факт, а то, что нас ожидает завтра, можно предсказать с помощью различного рода моделирования на основе данных мониторинга. Параллельно с мониторингом антибиотикорезистентности возбудителя необходимо не забывать об эпизоотологическом мониторинге актинобациллезной плевропневмонии, равно как и любой другой инфекционной болезни, в целях контроля интенсивности, динамики и напряженности эпизоотического процесса.

Данные мониторинга по уровню и характеру резистентности могут использоваться для:

- оценки временных тенденций и прогнозирования вероятности возникновения и распространения резистентных форм *Actinobacillus pleuropneumoniae*, путей распространения, факторов риска и возможных последствий их для свиноводства (неэффективность терапии, повышение стоимости лечения и др.);
- информирования ветеринарных специалистов и руководителей свиноводческих хозяйств о сложившейся ситуации с целью разработки стратегии по сдерживанию распространения болезни, вызванной антибиотикорезистентными актинобациллами, проведения надлежащих мероприятий по борьбе с распространением резистентных форм *Actinobacillus pleuropneumoniae*;

- внедрения в практику работы ветеринарных лабораторий соответствующих методов для своевременного и достоверного выявления лекарственно-устойчивых актинобацилл.

Ветеринарной науке и практике известны два методических подхода к мониторингу антибиотикорезистентности бактериальных патогенов: 1) постоянный мониторинг данных по антибиотикорезистентности и 2) эпизодический мониторинг.

По степени охвата различают:

- всеобъемлющий мониторинг, который предусматривает исследование антибиотикорезистентности возбудителя актинобациллезной плевропневмонии во всей популяции больных свиней свиноводческого комплекса, что является проблематичным;
- сигнальный мониторинг, подразумевающий сбор данных на ограниченной территории свиноводческого комплекса или у определенной части популяции больных свиней для получения данных, которые могут служить индикатором состояния антибиотикорезистентности во всей популяции в целом. При этом обследуемая популяция должна быть репрезентативной для всей популяции. Данный тип мониторинга является более предпочтительным при необходимости проведения длительного и детального сбора данных.

При проведении рутинного мониторинга антибиотикорезистентности *Actinobacillus pleuropneumoniae*, выделяемых в свиноводческих хозяйствах, необходимо проводить определение чувствительности всех изолятов актинобацилл, выделенных из патологического материала. Это позволит изучить динамику резистентности, уже распространенной в данном хозяйстве или регионе.

Для эффективного проведения мониторинга на каждом уровне его проведения (местном, региональном) должен регистрироваться минимально необходимый объем информации. Мероприятия, разрабатываемые на основе полученных данных, должны быть научно обоснованными.

Эффективность мониторинга актинобациллезной плевропневмонии свиней, вызванной антибиотикорезистентными актинобациллами, зависит от:

- получения качественного патологического материала;
- успешного выделения возбудителя болезни;
- квалифицированным определением чувствительности к антимикробным препаратам;
- анализа полученных данных;
- своевременного использования полученной информации.

Достоверность полученных данных зависит от правильного отбора и доставки патологического материала для исследования, стандартизации методов выделения, идентификации и определения чувствительности актинобацилл, интерпретации полученных результатов, соответствия работы лабораторий единым стандартам качества выполнения исследований.

Техника отбора патологического материала от трупов или больных свиней и доставки его для исследований детально прописана в нормативных документах по отбору проб патологического материала для лабораторных исследований в ветеринарных лабораториях.

При исследовании проб патологического материала должны приниматься во внимание эпизоотическая ситуация, цели и задачи проведения исследования, возможности лаборатории.

Для получения сравнимых данных о частоте выделения антибиотикорезистентных форм *Actinobacillus pleuropneumoniae* выделение и идентификация возбудителя должны проводиться в соответствии с действующими нормативно-методическими документами. Конечной целью проводимых исследований должно быть обнаружение, определение чувствительности вы-

деленного возбудителя к АБП и оценка распространенности антибиотикоустойчивых актинобацилл в стаде.

В регионах с высокой и средней распространенностью актинобациллезной плевропневмонии выделение возбудителя необходимо для периодического скрининга изменений в распространенности болезни, оценки контрольных интервалов между исследованиями для определения эффективности проводимых мероприятий и внесения необходимых изменений в график исследований, а также для выявления носителей актинобацилл среди клинически здоровых свиней.

При проведении мониторинговых исследований вначале желательно провести «пристрелочный контроль» за сероварами актинобацилл, связанными с заболеванием свиней. Известно, что в большинстве случаев тяжелые формы актинобациллезной плевропневмонии, вызванные антибиотикорезистентными штаммами бактерий, сопровождаются более высокой частотой летальных исходов, чем та же инфекция, но вызванная чувствительными штаммами актинобацилл. Несмотря на это, требует дальнейшего изучения вопрос о том, результатом чего является более высокий показатель летальности.

Современные стандартизированные методы определения чувствительности бактериальных патогенов к АБП подразделяют на метод серийных разведений и диффузионный [1].

Метод серийных разведений основан на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБП – величину его минимальной подавляющей концентрации (МПК).

МПК – минимальная концентрация, подавляющая видимый рост *Actinobacillus pleuropneumoniae* в бульонной культуре или на плотной питательной среде.

Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой актинобацилл, и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

В зависимости от характера используемой питательной среды различают метод серийных разведений в агаре или в бульоне.

Диффузионный метод определения чувствительности основан на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры актинобацилл в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

В настоящее время известно несколько основных модификаций диффузионного метода, из которых наибольшее распространение получил диско-диффузионный тест [7].

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

При проведении исследований предпочтение должно быть отдано по возможности количественному методу определения чувствительности, позволяющему

получить значения МПК АБП в отношении исследуемого штамма актинобацилл. В случае использования диско-диффузионного метода очень важным является регистрация не только качественных показателей категорий чувствительности актинобацилл, но и количественных показателей – диаметров зон подавления роста.

В большинстве случаев для проведения рутинного мониторинга антибиотикорезистентности актинобацилл достаточно определения чувствительности к АБП стандартного набора, выпускаемого биопредприятиями России.

При наличии необходимости и возможности, а также в целях проведения научно-исследовательских работ набор АБП для проведения мониторинга антибиотикорезистентности может быть увеличен.

В конечном итоге выбор АБП и используемых тестов определяется целями и задачами мониторинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение актинобациллезной плевропневмонии свиней продолжает оставаться одной из самых сложных проблем ветеринарии. Причиной недостаточной эффективности антибактериальной терапии является рост резистентности актинобацилл к традиционным антибактериальным препаратам, используемым в ветеринарии.

Опираясь на публикации отечественных и зарубежных авторов, а также собственные исследования, можно сделать вывод, что антибиотикорезистентность различных видов бактерий, в том числе и актинобацилл, является результатом практически повсеместного нерационального использования ветеринарными специалистами антибактериальных препаратов.

Проведение мониторинговых исследований резистентности актинобацилл к антимикробным препаратам – это назревшая проблема, решение которой позволит ветеринарной службе разработать надлежащие мероприятия по контролю и сдерживанию развития и распространения антибиотикорезистентности актинобацилл, оптимизации антибактериальной терапии актинобациллезной плевропневмонии, публикации данных по антибиотикорезистентности *Actinobacillus pleuropneumoniae* в России.

Всестороннее изучение проблемы антибиотикорезистентности сделает возможным разработку системы, позволяющей проводить мониторинг использования антибиотиков (выбор препарата, дозы, пути введения, кратности, количества курсов применения), оценивать его результаты и на их основе разрабатывать соответствующие рекомендации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания: МУК 4.2.1890-04. – Введ. 04.03.04. – М, 2004. – 92 с.
2. Потехин А. В., Русалеев В. С. Мониторинг антибиотикорезистентности изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012–2014 гг. // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1 (16). – С. 24–29.
3. Руководство по инфекционному контролю в стационаре: пер. с англ. / под ред. Р. Венцеля, Т. Бревера, Ж.-П. Бутцлера. – Смоленск: МАКМАХ, 2003. – 272 с.
4. Сидоров М. А., Скородумов Д. И. Гемофилезы животных. – М.: Агропромиздат, 1986. – 176 с.
5. Скородумов Д. И., Шубин В. А. Актинобациллезная пневмония свиней: патогенез и вирулентность культур *A. pleuropneumoniae* различной серовариантной принадлежности // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2005. – № 7. – С. 13–17.
6. Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010 / E. Portis, C. Lindeman, L. Johansen, G. Stoltman // J. Swine Health Prod. – 2013. – Vol. 21, No. 1. – P. 30–41.
7. Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. M31–A3 / J. L. Watts, T. R. Shryock, M. Apley [et al.]; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). – 3rd ed. – Wayne, 2008. – 128 p.

REFERENCES

1. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics. Methodical instructions: MG 4.2.1890-04. Intro. 04.03.04. M, 2004 (in Russian).
2. Potekhin A. V., Rusaleyev V. S. Monitoring of antibiotic resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Russian Federation in 2012–2014. *Veterinary Science Today*. 2016; 1 (16): 24–29 (in Russian).
3. A Guide to infection control in the hospital: Translation from English. ed. R. Wenzel, T. Brewer, J.-P. Butzler. Smolensk: MAKMAH, 2003 (in Russian).
4. Sidorov M. A., Skorodumov D. I. Glasser's disease. M.: Agropromizdat, 1986 (in Russian).
5. Skorodumov D. I., Shubin V. A. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs: pathogenesis and virulence of *A. pleuropneumoniae* cultures of different serovariants. *Veterinarija sel'skhozajstvennykh zhivotnykh*. 2005; 7: 13–17 (in Russian).
6. Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010. E. Portis, C. Lindeman, L. Johansen, G. Stoltman. *J. Swine Health Prod*. 2013; 21 (1): 30–41.
7. Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. M31–A3. J. L. Watts, T. R. Shryock, M. Apley [et al.]; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 3rd ed. Wayne, 2008.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 16.08.18



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ СТРАН СНГ В 2015–2017 ГГ.

Л. О. Щербакова¹, С. Н. Колосов², З. Б. Никонова³, Н. Г. Зиняков⁴, Е. В. Овчинникова⁵, И. А. Чвала⁶

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

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

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

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

⁵ Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

⁶ Заместитель директора по НИР и мониторингу, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Вирус инфекционного бронхита кур является причиной значительного экономического ущерба в птицеводстве, однако борьба с ним затруднена в связи с его высокой изменчивостью. Частота мутаций вируса, изолированного от вакцинированных птиц, достигает 1,5% в год в гипервариабельной области гена S1. В результате многолетнего наблюдения за циркуляцией изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в отдельных птицеводческих хозяйствах, было замечено, что со временем на птицефабрике может происходить смена генетических линий вируса. Это обуславливает необходимость постоянного мониторинга изолятов вируса для оптимизации схемы профилактики. В работе представлены результаты исследования 840 проб биологического материала, отобранного от кур из птицефабрик России и некоторых стран СНГ в 2015–2017 гг. Среди 311 положительных проб выявлено 147 изолятов вируса инфекционного бронхита кур, большая часть которых относится к 8 генетическим линиям генотипа GI: GI-1, GI-12, GI-13, GI-14, GI-16, GI-19, GI-22, GI-23. Кроме этого, были выявлены изоляты, являющиеся рекомбинантами, и варианты изоляты, не относящиеся ни к одному из известных генотипов.

Ключевые слова: вирус инфекционного бронхита кур, генетический анализ, генотип.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус инфекционного бронхита кур (ИБК) распространен повсеместно и встречается во всех странах, где развито птицеводство. Он относится к отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Coronavirinae*, роду *Gammacoronavirus*. Геном представлен одноцепочечной (+)РНК. Основными мишенями для вируса ИБК являются реснитчатый эпителий верхних дыхательных путей, эпителиальные клетки яйцеводов и почек.

Огромному разнообразию вируса ИБК способствует ряд факторов, таких как большое количество кур, содержащихся на птицефабриках с очень высокой плотностью, использование в хозяйствах живых вакцин разных серотипов и коциркуляция на птицефабриках генетически разнородных популяций вируса. Эволюционный процесс вируса ИБК происходит достаточно быстро. Непрерывное появление точечных мутаций,

инсерций и делеций, а также рекомбинаций (в случае одновременного размножения в одном хозяине генетически отличающихся изолятов) – все это приводит к появлению новых вариантов вируса [4]. Частота мутаций в гипервариабельной области гена S1 вируса ИБК, изолированного от вакцинированных птиц, достигает 1,5% в год, но при отсутствии поствакцинального иммунитета вирус эволюционирует более медленными темпами (0,3%) [11].

Высокая вариабельность генома вируса ИБК приводит к сложностям в классификации вируса. Постоянно появляются новые варианты вируса. Многие из них неспособны к воспроизводству или выживают только в течение короткого промежутка времени. Некоторые из вновь появившихся вариантов вируса ИБК становятся экономически значимыми, нанося существенный

урон птицеводческим хозяйствам. Они могут распространяться по разным регионам мира или могут поражать кур на ограниченной географической территории.

Еще 10 лет назад было выявлено всего несколько генотипов вируса ИБК: Massachusetts, D274, Connecticut, Holte, Arkansas, Taiwan-1, Taiwan-2, Grey, 793B, QX, Italy-02, Q1, Variant-1, Variant-2, B1648, D1466 и т. д. За последнее десятилетие количество новых генотипов значительно увеличилось. При большом разнообразии уже известных генотипов выявляются изоляты, не относящиеся ни к одному из ранее выявленных генотипов вируса ИБК. Такие изоляты принято называть вариантными.

В 2016 г. V. Valastro и соавт. [14] предложили рациональную и стандартизированную номенклатуру генетических групп вируса ИБК на основе сравнения 1286 последовательностей гена S1, исключая нуклеотидные последовательности рекомбинантных форм вируса ИБК. Всего было идентифицировано шесть генотипов (GI–GVI), включающих 32 генетические линии вируса ИБК.

Целью данной работы является проведение филогенетического анализа изолятов вируса ИБК, выявленных на птицефабриках РФ в 2015–2017 гг., с использованием новой классификации, а также выявление новых генетических линий вируса ИБК, появившихся в последние годы, с целью оптимального выбора вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали 840 проб внутренних органов (легкие, трахеи, почки, кишечника), инкубационные яйца, фекалии кур разных возрастов, полученные из птицефабрик Российской Федерации и Республик Беларусь, Таджикистан и Казахстан в 2015–2017 гг.

Реакции ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили в соответствии с методическими указаниями [1, 2].

Для генотипирования вируса ИБК использовали сравнительный анализ фрагмента гена S1 примерно 500 н. о. (позиция 112–653 н. о. на гене S относительно штамма H-120). Для анализа использовали нуклеотидные последовательности прототипных штаммов, предложенных V. Valastro и соавт. [14].

Определение нуклеотидной последовательности осуществляли по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченых терминирующих нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями штаммов вируса ИБК, опубликованными в международной базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3.

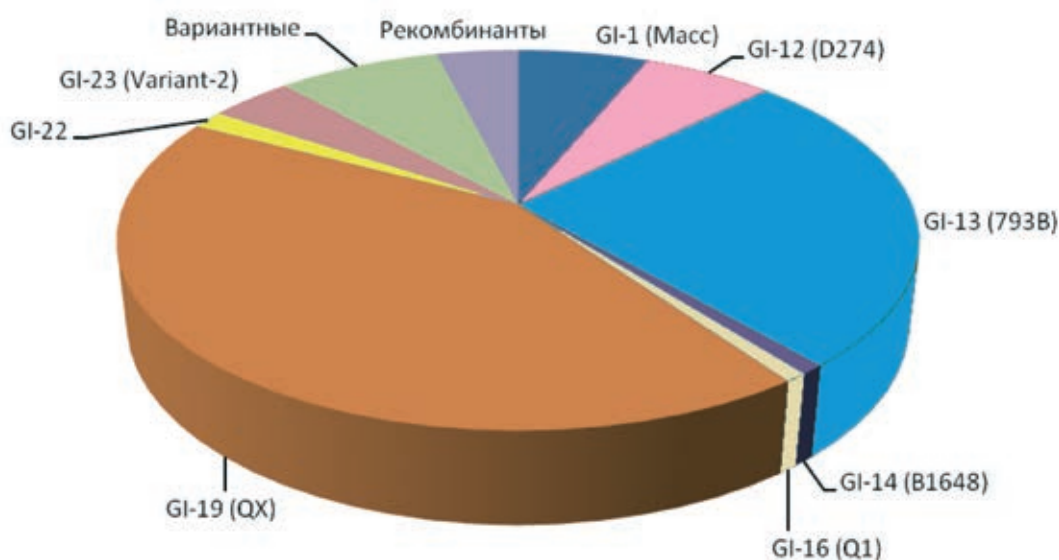
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За 2015–2017 гг. методом ПЦР было исследовано 840 проб биологического материала от птиц из более чем 50 хозяйств 26 регионов России, а также из Республик Беларусь, Таджикистан и Казахстан. Положительный результат получен в 420 случаях (50%). Геном вируса ИБК выявляли в яйце и во внутренних органах кур в возрасте до 578 сут.

Для определения и сравнительного анализа структуры фрагмента гена S1 были выбраны 311 проб, положительных в ОТ-ПЦР. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена S1 показал, что из числа положительных проб в 164 были выявлены вакцинные штаммы вируса ИБК (4/91, D274, H-120, Ma5). В 147 пробах были выявлены изоляты вируса ИБК, относящиеся к разным генетическим линиям (рис. 1). Филогенетический анализ этих изолятов показал, что большая часть из них относится к восьми генетическим линиям генотипа GI: GI-1 (Macc), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2). Кроме того, были выявлены изоляты, являющиеся рекомбинантами, и вариантные изоляты, не относящиеся ни к одному известному генотипу (рис. 1, 2). Изоляты генетических линий GI-16 (Q1), GI-22 и GI-23 (Variant-2) на птицефабриках РФ выявлены впервые.

Доминирующей группой является генетическая линия GI-19 (QX). Вирус данной линии выявляли у птиц разного возраста. Минимальный возраст птицы, у которой был выявлен изолят вируса ИБК генотипа GI-19 (QX), составлял 8 сут, максимальный – 578 сут. Впервые ви-

Рис. 1. Генетические линии вируса ИБК, выявленные в 2015–2017 гг.



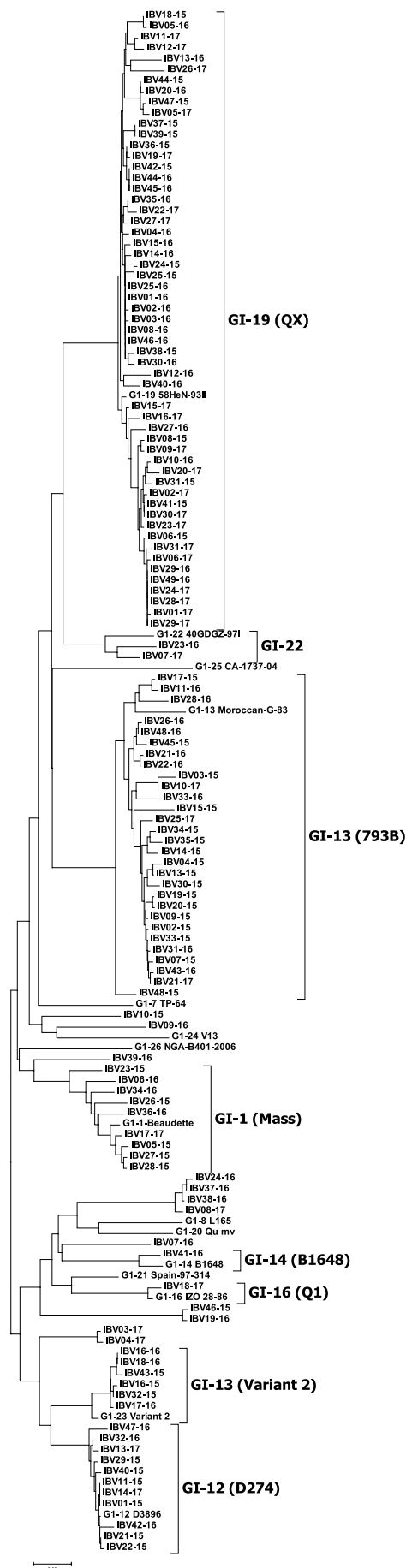


Рис. 2. Филогенетические связи штаммов и изолятов вируса ИБК на основе анализа фрагмента гена S1

рус GI-19 (QX) был изолирован в Китае [10]. В настоящее время вирус GI-19 (QX) широко распространен в Европе, Юго-Восточной Азии, Африке и на Ближнем Востоке [6]. Представители генетической линии GI-19 (QX) впервые были выявлены на территории РФ еще в 2001 г. [13].

Сравнительный анализ изолятов вируса ИБК, выявленных в течение трех лет, с 2015 по 2017 г., показывает, что каждый год кроме генетической линии GI-19 (QX) выявляются изоляты GI-1 (Масс), GI-12 (D274), GI-13 (793B) (рис. 2). Вероятно, часть изолятов, относящихся к этим трем генетическим линиям, может являться производной от вакцинных штаммов, применяемых на птицефабриках РФ в течение многих лет. Наиболее широко используются живые вакцины, полученные на основе штаммов H-120, MA5, D274 и 4/91.

Изоляты генотипа GI-14 (B1648) на российских птицефабриках выявляются спорадически. Нефропатогенный штамм вируса ИБК GI-14 (B1648) впервые был выделен в 1984 г. в Бельгии. Несмотря на интенсивную вакцинацию, GI-14 (B1648) и его варианты по-прежнему циркулируют в Европе и Северной Африке [8].

В 2015 г. на птицефабриках Казахстана и в 2016 г. в РФ был выявлен вирус генетической линии GI-23 (Variant-2). Ранее случаев выявления данного генотипа вируса ИБК на территории этих двух стран не было. Линия GI-23 представляет собой кластер уникального типа, географически ограниченный странами Среднего Востока. Штаммы, принадлежащие к этой линии, были обнаружены в 1998 г. в Израиле и продолжают циркулировать в этом регионе [7, 12]. Некоторые из них стали доминирующими для большинства ферм, вызывая респираторную и почечную патологии у кур [9].

В 2017 г. появились представители двух новых для РФ генетических линий вируса ИБК: GI-16 (Q1) и GI-22. Генетическая линия вируса ИБК GI-16 (Q1) была обнаружена у кур в Италии, Испании, Китае, в большинстве стран Латинской Америки и Ближнего Востока [6]. Результаты экспериментов, проводимых с вирусом GI-16 (Q1), впервые были опубликованы L. Yu и соавт. [5]. Вирус был изолирован из железистого желудка молодых несушек. При экспериментальном заражении у птиц проявлялись респираторные признаки заболевания, диарея, поражение железистого желудка. Смертность достигала очень высокого уровня (75–100%). В почках повреждений обнаружено не было. В то же время эксперименты с чилийскими изолятами генетической линии GI-16 (Q1) не выявили репликации вируса в железистом желудке, но показали, что вирус вызывает патологию в дыхательных путях и почках.

Изоляты генетической линии GI-22 выделили в Китае в результате вспышек ИБК у бройлеров и несушек с признаками поражения почек. Многочисленные эпидемиологические исследования, проведенные в Китае, показали, что генетические линии GI-22 и GI-19 являются доминирующими в этой стране.

О большом генетическом разнообразии циркулирующих изолятов вируса ИБК свидетельствует выявление в птицеводческих хозяйствах вариантных изолятов вируса ИБК, отличающихся по структуре гена S1 от всех известных генетических линий. Вариантные изоляты вируса ИБК были выявлены в Красноярском крае, Ленинградской и Владимирской областях, а также на территории Казахстана и Таджикистана. В 2016 г. из образцов внутренних органов кур одной из птице-



Рис. 3. Вывравнивание последовательностей фрагмента гена S1 рекомбинантных изолятов (IBV03-17 и IBV04-17) и предполагаемых родительских форм (вакцинные штаммы H-120 и D274)

На рисунке указана точка рекомбинации.

фабрик Ленинградской области выявили вариантный изолят вируса ИБК IBV24-16 одновременно с вакцинными штаммами 4/91 и Н-120. Повторные исследования, проведенные на той же птицефабрике через 3 и 9 месяцев, показали, что выявленные вариантные изоляты IBV37-16 и IBV08-17 отличаются от IBV24-16 на 1,5 и 3% соответственно.

Вариантный изолят IBV19-16, выявленный на птицефабрике во Владимирской области, циркулирует здесь не менее 10 лет. На других птицефабриках Российской Федерации аналогичные изоляты выявлены не были.

Вариантные изоляты обладают способностью инфицировать птиц, несмотря на вакцинацию. Преваляирование некоторых вариантов эндемично в отдельных географических областях. Они могут циркулировать в стаде птиц в течение некоторого времени, а потом исчезнуть. Другие варианты могут стать доминирующими и быстро распространяться на большие расстояния.

В течение последних лет для профилактики ИБК стали использовать комбинации различных вакцин и увеличили количество вакцинаций. Считается, что повторные вакцинации различными штаммами могут создать более эффективную защиту против большого разнообразия антигенных вариантов вируса ИБК.

Таким образом, в одной пробе наряду с изолятами нередко выявляются и вакцинные штаммы. В 30% случаев вместе с изолятами GI-19 (QX) одновременно выявляли вакцинные штаммы генетических линий GI-1 (Масс) или GI-13 (793B). В одной из проб одновре-

менно были выявлены два вакцинных штамма H-120 GI-1 (Масс) и 4/91 GI-13 (793B) и изолят GI-19 (QX).

При одновременной репликации вируса ИБК разных генетических линий в одном организме хозяина могут происходить рекомбинации, приводящие к появлению новых вариантов вируса. За период 2015–2017 гг. выявлено три вируса, у которых нуклеотидная последовательность гена S1 состояла из фрагментов двух родительских вирусов: GI-13 (4/91) и GI-12 (D274), GI-13 (4/91) и GI-1 (Масс), GI-1 (Масс) и GI-12 (D274). Ранее были описаны случаи выявления рекомбинантов, где родительскими вирусами были полевые вирусы генотипов QX и Масс, а также вакцинные штаммы D274, 4/91 и H-120 в разных комбинациях между собой, включая комбинацию из двух вакцинных штаммов H-120 и D274 [3].

В 2017 г. в двух пробах, полученных с птицефабрики из Марий Эл, были выявлены два изолята вируса ИБК (IBV03-17 и IBV04-17), часть гена S1 которых имела происхождение от вируса генетической линии GI-13 (D274), а другая часть – от GI-1 (Масс) (рис. 3). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена S1 обоих изолятов отличались друг от друга по 10 н. о., из них восемь нуклеотидных замен были несинонимичными. Интересным является факт, что изолят IBV03-17 был выявлен из проб внутренних органов несушки в возрасте 224 сут, а изолят IBV04-17 – из инкубационного яйца. Даже если в популяции кур в данный момент циркулирует вирус одного генотипа, вирусная популяция тем не менее не является однородной. В инфицированном

хозяине вирус ИБК существует в виде набора вирионов, содержащих слегка измененные, но близкородственные геномы, так называемые квазивиды. Квазивиды образуются в результате мутаций и рекомбинаций, которые происходят в результате ошибки репликации вирусного генома. Генетические изменения, активно происходящие в популяции, позволяют вирусу ИБК быстро адаптироваться к хозяину путем отбора наиболее подходящей вирусной субпопуляции. Такой отбор обеспечивает долгосрочное выживание вируса в организме и популяции хозяина, приводит к изменениям в патогенезе вируса и появлению новых вариантов вируса ИБК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате филогенетического анализа изолятов вируса ИБК, выявленных в 2015–2017 гг., было показано, что на территории РФ циркулируют полевые вирусы, относящиеся к восьми генетическим линиям генотипа GI: GI-1 (Масс), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2). Изоляты генетических линий GI-16 (Q1), GI-22 и GI-23 (Variant-2) на птицефабриках РФ выявлены впервые. Кроме того, были выявлены изоляты, являющиеся рекомбинантами, и вариантные изоляты, не относящиеся ни к одному известному генотипу.

Несмотря на многократную вакцинацию против ИБК с использованием штаммов H-120 и 4/91, продолжается распространение изолятов генетической линии GI-19 (QX) на птицефабриках РФ. Вероятно, необходимо пересмотреть стратегию вакцинации против ИБК на тех птицефабриках, где выявлены изоляты GI-19 (QX).

Анализ изолятов вируса ИБК, выявленных в отдельных птицеводческих хозяйствах в течение нескольких лет, показал, что со временем на птицефабрике происходит смена генетических линий вируса, что обуславливает необходимость постоянного мониторинга циркулирующих изолятов вируса ИБК для дальнейшей оптимизации схемы профилактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Индикация генома вируса инфекционного бронхита кур с помощью полимеразной цепной реакции / Ю. А. Бочков, В. В. Дрыгин, А. В. Борисов [и др.] // Совр. аспекты вет. патологии ж-ных: докл. конф. – Владимир, 1998. – С. 173–183.
2. Методические указания по выявлению генома вируса инфекционного бронхита кур с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Е. В. Ов-

чинникова, Л. О. Щербакова, А. В. Андриясов [и др.]. – Владимир, ФГУ «ВНИИЗЖ», 2010. – 10 с.

3. Овчинникова Е. В. Молекулярно-биологические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных на территории России в период с 2005 по 2011 гг.: дис. ... канд. биол. наук. – Владимир, 2012. – 116 с.

4. Cavanagh D., Gelb Jr. J. F. Infectious bronchitis // *Diseases of Poultry* / ed Y. M. Saif. – 12th ed. – Hoboken, Wiley-Blackwell, 2008. – P. 117–135.

5. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens / L. Yu, Y. Jiang, S. Low [et al.] // *Avian Dis.* – 2001. – Vol. 45, No. 2. – P. 416–424.

6. Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach / J. J. de Wit, C. Cazaban, R. Dijkman [et al.] // *Avian Pathol.* – 2018. – Vol. 47, No. 2. – P. 140–151; DOI: 10.1080/03079457.2017.1387231.

7. Ganapathy K., Ball C., Forrester A. Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014 // *Virus Res.* – 2015. – Vol. 210. – P. 198–204; DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.019.

8. Genetic characterization of the Belgian nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) reference strain B1648 / V. R. Reddy, S. Theuns, I. D. Roukaerts [et al.] // *Viruses.* – 2015. – Vol. 7, No. 8. – P. 4488–4506; DOI: 10.3390/v7082827.

9. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel / R. Meir, E. Rosenblut, S. Perl [et al.] // *Avian Dis.* – 2004. – Vol. 48, No. 3. – P. 635–641.

10. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China / S. Liu, J. Chen, Z. Han [et al.] // *Avian Pathol.* – 2006. – Vol. 35, No. 5. – P. 394–399; DOI: 10.1080/03079450600920984.

11. Lee C. W., Jackwood M. W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus // *Virus Res.* – 2001. – Vol. 80, No. 1–2. – P. 33–39.

12. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014–2015 / H. Najafi, A. G. Langeroudi, M. Hashemzadeh [et al.] // *Arch. Virol.* – 2016. – Vol. 161, No. 1. – P. 53–62; DOI: 10.1007/s00705-015-2636-3.

13. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y. A. Bochkov, G. V. Batchenko, L. O. Scherbakova [et al.] // *Avian Pathol.* – 2006. – Vol. 35, No. 5. – P. 379–393.

14. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification / V. Valastro, E. C. Holmes, P. Britton [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* – 2016. – Vol. 39. – P. 349–364; DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.015.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 10.08.18

GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATES RECOVERED IN CIS COUNTRIES IN 2015–2017

L. O. Scherbakova¹, S. N. Kolosov², Z. B. Nikonova³, N. G. Zinyakov⁴, Ye. V. Ovchinnikova⁵, I. A. Chvala⁶

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

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

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

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

⁵ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

⁶ Deputy Director for Research and Monitoring, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

Avian infectious bronchitis virus is a cause of major economic losses in poultry industry. However, control of the virus is very complicated due to its high variability. The mutation frequency in the hypervariable region of the S1 gene of the virus isolated from the vaccinated birds annually amounts to 1.5%. Long-term observations of the circulation of IBV isolates detected in a number of poultry farms demonstrated that the virus genetic lineages circulating on the poultry farms could eventually change. This stipulates the need for the continuous monitoring of the virus isolates for the prevention schedule optimization. The paper demonstrates test results of 840 biological samples collected from chickens on the poultry farms in Russia and some CIS countries in 2015–2017. From 311 positive samples 147 IBV isolates were recovered, the majority of which belonged to eight genetic lines of GI genotype: GI-1, GI-12, GI-13, GI-14, GI-16, GI-19, GI-22, GI-23. Moreover, recombinant isolates were detected as well as variant isolates that belonged to none of the known genotypes.

Key words: avian infectious bronchitis virus, genetic analysis, genotype.

INTRODUCTION

Avian infectious bronchitis virus (IBV) is ubiquitous and occurs in all countries having well-developed poultry industry. It belongs to order *Nidovirales*, family *Coronaviridae*, subfamily *Coronavirinae*, genus *Gammacoronavirus*. The virus genome is a single-stranded (+)RNA. The IBV is mainly targeted at the ciliated epithelium of the upper respiratory tract and epithelial cells of the oviduct and kidneys.

There is a number of factors contributing to the enormous IBV diversity and *inter alia* the following: high density of a large number of chickens being kept on the poultry farms, use of live vaccines based on the viruses of different serotypes and co-circulation of genetically diverse virus populations on the poultry farms. The IBV evolution process is rather rapid. Continuous occurrence of point mutations, insertions and deletions as well as recombinations (in case of simultaneous reproduction of genetically

different isolates in the same host) – all these result in the emergence of new virus variants [4]. Frequency of mutations within the hypervariable region of S1 gene of the IBV isolated from the vaccinated birds annually amounts to 1.5% but the virus evolution is slower in the absence of the postvaccinal immunity (0.3%) [11].

High variability of the IBV genome complicates the virus classification. New virus variants emerge continuously. Most of them cannot reproduce or can survive only for a short period of time. Some of emerging IBV variants become economically relevant and cause significant damage to poultry farms. They are capable of spreading over different regions of the world or affecting chickens within the limited geographic area.

As far as ten years ago, only several IBV genotypes were identified: Massachusetts, D274, Connecticut, Holte,

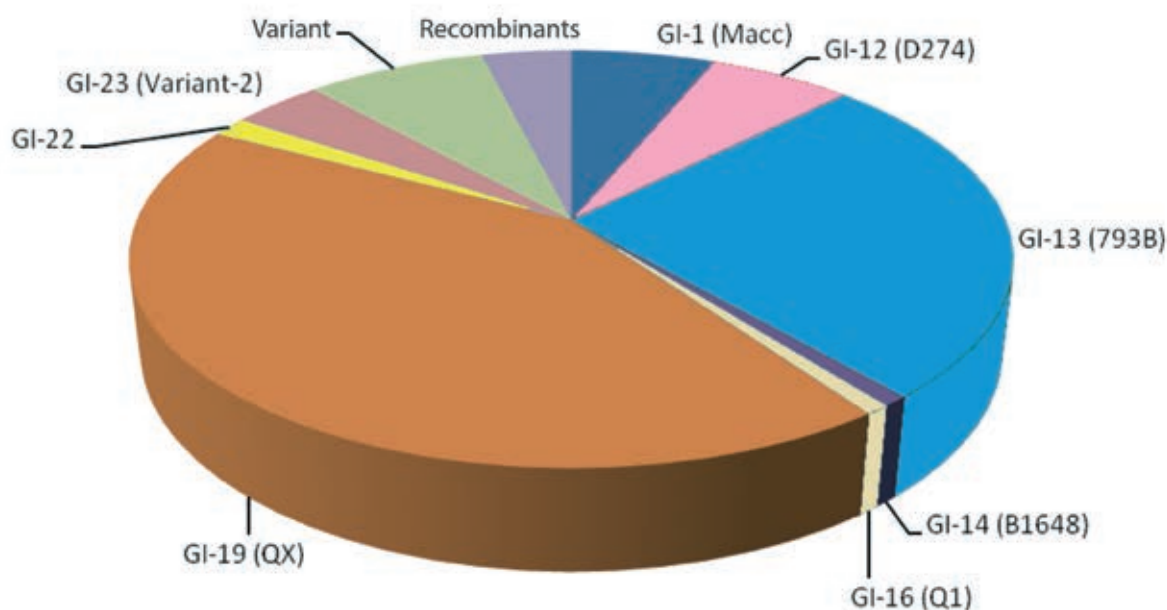


Fig. 1. Genetic lineages of IBV isolated in 2015–2017

Arkansas, Taiwan-1, Taiwan-2, Grey, 793B, QX, Italy-02, Q1, Variant-1, Variant-2, B1648, D1466, etc. Over the recent decade, the number of new genotypes significantly increased. Despite great variety of already known genotypes, new isolates are still being recovered that belong to neither of the previously identified IBV genotypes. Such isolates are called variant ones.

In 2016, V. Valastro et al. [14] suggested practical and standardized list of IBV genetic groups based on the comparison of 1286 sequences of S1 gene excluding nucleotide sequences of recombinant IBV forms. Altogether, six genotypes (GI–GVI) were identified including 32 genetic lineages of IBV.

The key goal of the work was to perform the phylogenetic analysis of IBV isolates recovered on the RF poultry farms in 2015–2017 using new classification and to identify new IBV genetic lineages emerged over the recent years for the optimal selection of the proper vaccine.

MATERIALS AND METHODS

The testing was performed using 840 samples of internal organs (lungs, trachea, kidneys, and intestines), hatching eggs and feces of chicken of different ages. The samples were received from the poultry farms located in the Russian Federation and Republic of Belarus, Tajikistan and Kazakhstan in 2015–2017.

RT-PCR and real-time RT-PCR were run according to the methodical instructions [1, 2].

Comparative analysis of about 500 bp fragment of S1 gene (position 112–653 bp of S gene of H-120 strain) was performed for IBV genotyping. Nucleotide sequences of prototype strains proposed by V. Valastro et al. were used for the analysis [14].

The nucleotide sequences were determined according to Sanger method involving fluorescence labeled chain-terminating nucleotides. The sequencing was carried out using ABI Prism 3130 sequencer (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions. The resulted nucleotide sequences were compared with IBV sequences

deposited in the international database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using BioEdit software, version 7.0.5.3.

RESULTS AND DISCUSSION

In 2015–2017, 840 biomaterial samples collected from poultry on 50 farms in 26 regions of Russia and in the Republics of Belarus, Tajikistan and Kazakhstan were PCR tested. 420 test results were positive (50%). IBV genome was detected in eggs and in the internal organs of chickens at the age of below 578 days old.

Total of 311 RT-PCR-positive samples were selected for identification and comparative analysis of the structure of S1 gene fragment. Comparative analysis of nucleotide sequences of S1 gene fragment demonstrated that out of all positive samples 164 bore vaccine IBV strains (4/91, D274, H-120, Ma5). 147 samples contained IBV isolates belonging to various genetic lineages (Fig. 1). The phylogenetic analysis of these isolates demonstrated that their majority belonged to eight genetic lineages of GI genotype: GI-1 (Macc), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2). Furthermore, recombinant and variant isolates were recovered that belonged to neither of the known genotypes (Fig. 1, 2). The isolates of genetic lineages GI-16 (Q1), GI-22 and GI-23 (Variant-2) were recovered on the RF poultry farms for the first time.

Genetic lineage GI-19 (QX) is the dominating one. The viruses of this lineage were isolated from the birds of different ages. The minimal age of the birds the GI-19 genotype IBV was isolated from amounted to 8 days old, the maximal – 578 days old. GI-19 (QX) virus was first isolated in China [10]. Currently (QX) virus is wide spread in Europe, South-Eastern Asia, Africa and Near East [6]. Representatives of GI-19 (QX) genetic lineage were first isolated in the Russian Federation as early as in 2001 [13].

Comparative analysis of IBV isolates recovered from 2015 to 2017 demonstrated that beside genetic lineage GI-19 (QX), every year GI-1 (Macc), GI-12 (D274), GI-13 (793B) isolates were recovered (Fig. 2). Part of the isolates belonging to these three genetic lineages was likely to be

the derivatives of the vaccine strains used in the RF poultry farms for many years. In the most general use are live vaccines based on strains H-120, MA5, D274 and 4/91.

Genotype GI-14 (B1648) isolates are sporadically recovered on the Russian poultry farms. Nephropathogenic IBV strain GI-14 (B1648) was first isolated in Belgium in 1984. Despite mass vaccination, GI-14 (B1648) and its variants are still circulating in Europe and Central Africa [8].

In 2015, virus of genetic lineage GI-23 (Variant-2) was detected on poultry farms in Kazakhstan, and in 2016 – in the Russian Federation. IBV of such genotype had never been detected in these two countries before. Lineage GI-23 is a unique cluster, which is geographically confined within the Middle East countries. The strains belonging to this lineage were detected in Israel in 1998 and continue their circulation in this region [7, 12]. Some of the strains became prevailing on the majority of the farms and induced respiratory and renal pathology in chickens [9].

In 2017, representatives of two, novel for Russia, IBV genetic lineages emerged: GI-16 (Q1) and GI-22. IBV genetic lineage GI-16 (Q1) was detected in chickens in Italy, Spain, and China, as well as in the majority of the countries in Latin America and Near East [6]. Results of the experiments involving GI-16 (Q1) virus were first published by L. Yu et al. [5]. The virus was isolated from proventriculus of young layers. Experimental infection of birds resulted in respiratory signs, diarrhea and proventriculus lesions. The mortality reached very high level (75100%). No lesions were reported in kidneys. Herewith, experiments involving Chilean isolates of genetic lineage GI-16 (Q1) demonstrated no virus replication in the proventriculus but indicated the virus-induced lesions in the respiratory tract and kidneys.

Isolates of genetic lineage GI-22 were recovered in China during IB outbreak in broilers and layers demonstrating kidney lesions. Numerous epidemic investigations performed in China demonstrated prevalence of genetic lineages GI-22 and GI-19 in the country.

Variant IBV isolates with S1 gene structure different from all other known genetic lineages being detected on the poultry farms are indicative of a wide genetic diversity of the circulating IBV isolates. Variant IBV isolates were detected in the Krasnoyarsk Krai, Leningrad and Vladimir Oblasts as well as in Kazakhstan and Tajikistan. In 2016, a variant isolate IBV24-16 was recovered from the samples of internal organs collected from chickens on one of the farms in the Leningrad Oblast. The isolate was recovered together with the vaccine strains 4/91 and H-120. The repeated testing performed on the same farm in three and nine months demonstrated that the recovered variant isolates IBV37-16 and IBV08-17 were different from IBV24-16 by 1.5 and 3%, respectively. The variant isolate IBV19-16 recovered on the poultry farm in the Vladimir Oblast has been circulating here for at least ten years. No similar isolates were detected on other poultry farms of the Russian Federation.

The variant isolates demonstrate capacities to infect birds despite vaccination. Prevalence of some variants is endemic in some geographic regions. They can circulate in the poultry herd for some time and then disappear.

Other variants can become prevailing and they can rapidly spread over the long distances.

Over the recent years, combinations of various vaccines are used for IB prevention and the number of vaccinations is increased. Repeated vaccination with different strains

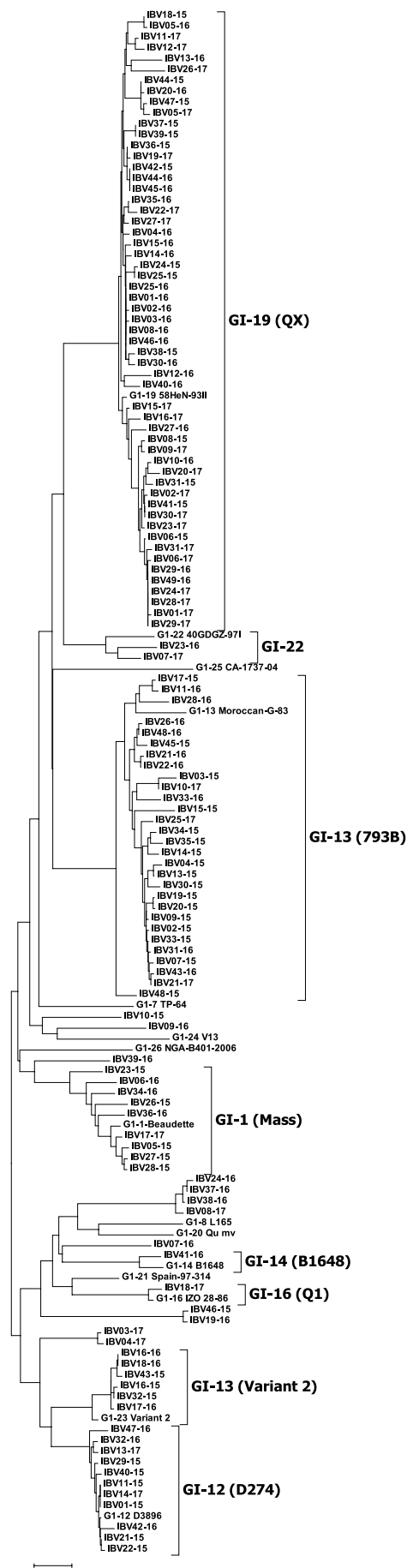


Fig. 2. Phylogenetic relations of IBV strains and isolates based on the analysis of S1 gene fragment



Fig. 3. Sequence alignment of S1 gene fragment of recombinant isolates (IBV03-17 and IBV04-17) and supposed parents (vaccine strains H-120 and D274)

Recombination point is shown in the figure.

is considered to have the potential for inducing more effective protection against vast variety of antigenic variants of IBV.

Thus, the vaccine strains along with the isolates can be detected in the same sample. In 30% of cases, the vaccine strains of genetic lineages GI-1 (Macc) or GI-13 (793B) were detected along with GI-19 (QX) isolates. One of the samples simultaneously demonstrated two vaccine strains H-120 – GI-1 (Macc) and 4/91 GI-13 (793B) – and isolate GI-19 (QX).

Simultaneous replication of IBV of different lineages in the same host can result in recombination leading to new virus variant emergence.

In 2015–2017, three viruses were detected, whose nucleotide sequence in S1 gene consisted of two fragments of two parent viruses: GI-13 (4/91) and GI-12 (D274), GI-13 (4/91) and GI-1 (Macc), GI-1 (Macc) and GI-12 (D274). There were previously reported cases of recombinant detections, where the parent viruses were represented by the field isolates of genotypes QX and Macc, as well as by the vaccine strains D274, 4/91 and H-120 in different combinations including combination of H-120 and D274 [3].

In 2017, two samples from poultry farm in Mari-El demonstrated two IBV isolates (IBV03-17 and IBV04-17). Part of S1 gene of these isolates originated from the virus of genetic lineage GI-13 (D274), and the other part originated from GI-1 (Macc) (Fig. 3). The nucleotide sequences

of S1 gene fragments of the isolates differed only by ten bp and out of them eight nucleotide substitutions were nonsynonymous. Of interest is the fact that isolate IBV03-17 was recovered from the sample of the internal organs of 224-day-old layer and isolate BV04-17 – from hatching egg. Even if the virus of some genotype is currently circulating in the chicken population, however, the virus population is not homogenous. In the infected host the IBV exists as a set of virions bearing slightly changed but closely related genomes, the so called quasispecies. The quasispecies are the result of mutations and recombinations occurring due to the error of the virus genome replication. The genetic changes actively occurring in the population allow rapid IBV adaptation to the host through the selection of the most suitable virus population. Such selection allows for the long survival of the virus in the host itself and in the host population and results in the changes of the virus pathogenesis and emergence of new IBV variants.

CONCLUSION

Results of the phylogenetic analysis of the IBV isolates recovered in 2015–2017 demonstrated that field isolates of eight genetic lineages of GI genotype including GI-1 (Macc), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2)) circulated in the Russian Federation. The isolates of genetic lineages GI-16

(Q1), GI-22 and GI-23 (Variant-2) were detected on the RF poultry farms for the first time. Besides, some recombinant isolates and variant isolates were recovered that belonged to neither of the known genotypes.

Despite the repeated IB vaccination using strains H-120 and 4/91, the spread of the isolates belonging to genetic lineage GI-19 (QX) over the poultry farms in the Russian Federation is still continuing. The IB vaccination strategy should be reviewed on the poultry farms where isolates GI-19 (QX) are detected.

Analysis of the IBV isolates recovered on some poultry farms during several years demonstrated that change of the virus genetic lineages on the farm in the course of time preconditions the need for continuous monitoring of circulating IBV isolates for further optimization of the prevention scheme.

REFERENCES

1. Indication of infectious bronchitis virus genome using polymerase chain reaction. Yu. A. Bochkov, V. V. Drygin, A. V. Borisov [et al.]. *Current aspects of animal pathology: conference proceedings*. Vladimir, 1998:173–183 (in Russian).
2. Methodical instructions for detection of infectious bronchitis virus genome using real-time polymerase chain reaction. Ye. V. Ovchinnikova, L. O. Scherbakova, A. V. Andriyasov [et al.]. Vladimir, FGI "ARRIAH", 2010 (in Russian).
3. Ovchinnikova Ye.V. Molecular and biological properties of infectious bronchitis virus isolates recovered in Russia in 2005–2011: thesis ... Candidate of Science (Biology). Vladimir, 2012 (in Russian).
4. Cavanagh D., Gelb Jr. J. F. Infectious bronchitis. Diseases of Poultry. Ed. Y. M. Saif. 12th ed. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2008: 117–135.
5. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. L. Yu, Y. Jiang, S. Low [et al.]. *Avian Dis.* 2001; 45 (2): 416–424.
6. Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. J. J. de Wit, C. Cazaban, R. Dijkman [et al.]. *Avian Pathol.* 2018; 47 (2): 140–151; DOI: 10.1080/03079457.2017.1387231.
7. Ganapathy K., Ball C., Forrester A. Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. *Virus Res.* 2015; 210: 198–204; DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.019.
8. Genetic characterization of the Belgian nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) reference strain B1648. V. R. Reddy, S. Theuns, I. D. Roukaerts [et al.]. *Viruses.* 2015; 7 (8): 4488–4506; DOI: 10.3390/v7082827.
9. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. R. Meir, E. Rosenblut, S. Perl [et al.]. *Avian Dis.* 2004; 48 (3): 635–641.
10. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. S. Liu, J. Chen, Z. Han [et al.]. *Avian Pathol.* 2006; 35 (5): 394–399; DOI: 10.1080/03079450600920984.
11. Lee C. W., Jackwood M. W. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 2001; 80 (1–2): 80.
12. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014–2015. H. Najafi, A. G. Langeroudi, M. Hashemzadeh [et al.]. *Arch. Virol.* 2016; 161 (1): 53–62; DOI: 10.1007/s00705-015-2636-3.
13. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y. A. Bochkov, G. V. Batchenko, L. O. Scherbakova [et al.]. *Avian Pathol.* 2006; 35 (5): 379–393.
14. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. V. Valastro, E. C. Holmes, P. Britton [et al.]. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 349–364; DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.015.

Submitted 05.06.18

Approved for publication 10.08.18

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТИМУСА УТОК ПЕКИНСКОЙ ПОРОДЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ ДАФС-25к

В. В. Пронин¹, Е. О. Анисимова², М. С. Дюмин³, С. П. Фисенко⁴

¹Руководитель центра доклинических исследований, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pronin@arriah.ru

²Младший научный сотрудник, ООО «МБЦ «Генериум», г. Москва, Россия, e-mail: katerina.anisimova.91@mail.ru

³Доцент, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Ивановская ГСХА им. Д. К. Беляева», г. Иваново, Россия, e-mail: dms-magus@mail.ru

⁴Доцент, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Ивановская ГСХА им. Д. К. Беляева», г. Иваново, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты гистологического исследования структуры тимуса уток пекинской породы на фоне применения кормовой добавки ДАФС-25к. Установлено, что у суточных утят тимус является морфологически зрелым и активно функционирующим органом. С возрастом отмечено увеличение размеров его долек у утят контрольной и опытной групп, однако под влиянием селена более интенсивно увеличивается площадь корковой зоны. В 45-суточном возрасте у утят опытной группы наблюдается достоверное увеличение показателя корково-мозгового отношения преимущественно за счет расширения площади корковой зоны. У интактных утят площадь коркового вещества не изменилась, отмечена тенденция увеличения площади мозгового вещества, что в таком возрасте является признаком акцидентальной инволюции, связанной с началом смены ювенильного пуха на первичное перо. Под влиянием селена в тимусе утят опытной группы отмечено нивелирование процессов акцидентальной инволюции, активнее протекают процессы синтеза тимопоэтинов и пролиферации тимоцитов. До 75-суточного возраста в тимусе утят обеих групп идет активная пролиферация тимоцитов, однако в опытной группе под влиянием селена отмечены более высокие показатели корково-мозгового отношения, четкая граница между ними, а также достоверно более высокие показатели количества и размеров телец Гассала. С 90-суточного возраста в органе отмечаются признаки возрастной инволюции, причем в опытной группе они протекают более физиологично, соответственно возрасту птиц. Использование в рационе утят селеноорганического препарата ДАФС-25к в дозе 1,3 мг/кг корма способствовало повышению функциональной активности тимуса, нивелированию процессов развития акцидентальной и оптимизации возрастной инволюции.

Ключевые слова: тимус, утки пекинской породы, ДАФС-25к, тельца Гассала, тимоциты

ВВЕДЕНИЕ

Птицеводство – одна из ведущих отраслей в производстве мяса, способная гибко и за короткий срок приспособиться к запросам потребителя [2]. В сложившейся структуре АПК производителя мяса уток составляет около 5% [3], однако это направление имеет перспективу развития, связанную с низкими затратами при выращивании уток и высокими потребительскими свойствами мясной продукции [1]. В практике птицеводства полному раскрытию генетического потенциала птицы препятствуют стрессы, обусловленные интенсивными технологиями производства, нарушениями кормления и содержания, что вызывает вторичные иммунные дефициты, для которых характерна, в частности, акцидентальная инволюция тимуса [4]. Морфология иммунокомпетентных органов у птиц вызывает интерес многих исследователей [5, 7, 8]. Имеются работы, посвященные изучению тимуса уток в отдельные периоды онтогенеза [6]. Однако в доступной литературе сведения, касающиеся

влияния на микроструктуру тимуса уток пекинской породы использования с кормом селеноорганической добавки ДАФС-25к, отсутствуют.

В связи с вышеизложенным целью работы было изучение гистоструктуры тимуса уток пекинской породы на фоне применения кормовой добавки ДАФС-25к.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужил тимус уток пекинской породы от одно- до 120-суточного возраста, полученных в КФХ «Ромашино» (Московская обл.), благополучном по инфекционным и инвазионным заболеваниям.

Кормление и условия содержания птицы соответствовали зоогигиеническим и зоотехническим нормам, рекомендованным ВНИТИП для данного вида птицы.

Фактическое определение селена в кормах, используемых в хозяйстве для выращивания уток, провели с помощью атомно-адсорбционного спектрометра

MORPHOFUNCTIONAL EVALUATION OF THYMUS IN PEKIN DUCK DURING DIETARY INCORPORATION OF ORGANIC SELENIUM FEED ADDITIVE DAFS-25k

V. V. Pronin¹, Ye. O. Anisimova², M. S. Dyumin³, S. P. Fisenko⁴

¹ Head of Preclinical Research Center, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: pronin@arriah.ru

² Junior Researcher, OOO "MBC "Generium", Moscow, Russia, e-mail: katerina.anisimova.91@mail.ru

³ Docent, Candidate of Science (Biology), FGBOU VO "Ivanovo State Agricultural Academy named after D. K. Belyaev", Ivanovo, Russia, e-mail: dms-magus@mail.ru

⁴ Docent, Candidate of Science (Biology), FGBEI VO "Ivanovo State Agricultural Academy named after D. K. Belyaev", Ivanovo, Russia

SUMMARY

The histological study results of the thymus structure of Pekin ducks during administration of DAFS-25k feed additive are presented. It has been established that the thymus is a morphologically mature and actively functioning organ in one-day-old Pekin ducklings. With age an increase in the size of thymus lobules was observed in ducklings in the control and experimental groups but under the influence of selenium the cortical area increased more intensively. 45-day-old ducklings in the experimental group demonstrated a reliable increase in the ventricular-brain ratio mainly due to the expansion of the cortical area. The surface of the cortical substance did not change in intact ducklings, the tendency of extension in the surface of the brain substance was observed, which at that age is a sign of an accidental involution associated with the onset of a plumage change from juvenile down to primary feathers. Under the influence of selenium in the thymus of the ducklings of the experimental group the processes of accidental involution are leveled, the processes of synthesis of thymopoietins and proliferation of thymocytes are more active. Up to age of 75 days there is active proliferation of thymocytes in the thymus of ducklings of both groups; however reliably higher parameters of ventricular-brain ratio under the influence of selenium were observed in the experimental group, there was a clear boundary between them, as well as significantly higher quantity and size parameters of Hassal's corpuscles were noted. From the age of 90 days signs of age involution in the organ were observed, and in the experimental group these processes were going more physiologically in accordance with the age of the birds. Introduction of the organic and selenium additive DAFS-25k in the diet of ducklings at a dose of 1.3 mg/kg of feed promoted the increase of the functional activity of the thymus that leveled the development of accidental involution and optimization of age involution.

Key words: thymus, Pekin duck, DAFS-25k, Hassal's corpuscles, thymocytes.

МГА-915МД в Костромской областной ветеринарной лаборатории. В результате исследования выявили, что дефицит селена в рационе составляет 1,3 мг/кг корма.

С целью изучения влияния селена на развитие и функциональную активность тимуса был проведен научно-производственный опыт в КФХ «Анисимов» (Владимирская обл.). Для проведения опыта по принципу аналогов были сформированы две группы уток суточного возраста. Первая (опытная) получала с рационом кормовую добавку ДАФС-25к, содержащую органический селен в дозе, восполняющей его дефицит. Кормовую добавку вводили в рацион путем многоступенчатого смешивания с кормом. ДАФС-25к – сыпучий порошок от белого до светло-желтого цвета, со слабым специфическим запахом, нерастворим в воде, растворим в растительном масле, содержит действующее вещество диацетофенонилселенид не менее 95%, с массовой долей селена 25%, усвояемость селена из ДАФС-25к составляет 76–100%. Вторая (контрольная) группа по-

лучала рацион, принятый в хозяйстве. Для изучения влияния селена на морфофункциональное состояние тимуса проводили убой и анатомическое вскрытие птицы (по общепринятым методикам), по пять голов из каждой группы, с интервалом в 15 сут.

Обработку гистологического материала проводили в центре доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», функционирующего в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) ОЭСР. Образцы фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Проводку осуществляли в гистологическом процессоре скоростной проводки Tissue-Tek® Xpress™ X50. Уплотняли в парафине в заливочном гистологическом центре Leica EG1160. С помощью ротационного микротомы Leica RM2125 RT разлагали на срезы (толщина среза 4–5 мкм) парафиновые блоки. Проводили депарафинирование, окраску срезов гематоксилином и эозином и заключение под покровное стекло на рабочей станции Leica ST5010 Auto-

Таблица
Морфометрические данные тимуса уток пекинской породы в возрастном аспекте, $M \pm m$

Возраст, сут	Площадь коркового вещества, $\text{мкм}^2 \times 10^5$		Площадь мозгового вещества, $\text{мкм}^2 \times 10^5$		Соотношение коркового и мозгового вещества		
	К	О	К	О	К	О	
1	$1,76 \pm 0,12$		$1,05 \pm 0,08$		$1,68 \pm 0,11$		
15	$1,94 \pm 0,14$	$2,32 \pm 0,16$	$1,06 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,08$	$1,83 \pm 0,14$	$2,05 \pm 0,11$	
30	$2,14 \pm 0,16$	$2,75 \pm 0,13^*$	$1,53 \pm 0,11$	$1,46 \pm 0,12$	$1,40 \pm 0,08$	$1,88 \pm 0,07^*$	
45	$2,12 \pm 0,13$	$3,19 \pm 0,22^*$	$1,75 \pm 0,11$	$1,45 \pm 0,08^*$	$1,21 \pm 0,07$	$2,20 \pm 0,12^*$	
60	$4,03 \pm 0,14$	$5,37 \pm 0,21^*$	$2,67 \pm 0,18$	$2,04 \pm 0,18^*$	$1,51 \pm 0,11$	$2,38 \pm 0,18^*$	
75	$4,68 \pm 0,32$	$5,78 \pm 0,43^*$	$2,83 \pm 0,12$	$2,25 \pm 0,20^*$	$1,65 \pm 0,11$	$2,57 \pm 0,18^*$	
90	$3,33 \pm 0,21$	$4,35 \pm 0,17^*$	$4,07 \pm 0,16$	$3,20 \pm 0,19^*$	$0,82 \pm 0,07$	$1,34 \pm 0,12^*$	
105	$3,54 \pm 0,11$	$4,10 \pm 0,21^*$	$4,46 \pm 0,16$	$3,52 \pm 0,14^*$	$0,79 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,11^*$	
120	$3,09 \pm 0,21$	$3,68 \pm 0,11$	$5,19 \pm 0,18$	$4,67 \pm 0,31$	$0,59 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,06^*$	

* $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем;

К – контрольная группа;

О – опытная группа.

stainer XL/CV5030 с использованием среды BioMount. Исследовали под микроскопом Leica DM1000 и Leica DMB и фотодокументировали.

Статистическую обработку цифровых данных проводили биометрическим методом. Определяли среднюю арифметическую и отклонение ($M \pm m$):

$$M = \frac{\sum X}{n}; m = \frac{\sum (X - M)^2}{n},$$

где M – средняя арифметическая имеющихся данных;
 X – цифровое значение изучаемого объекта;
 m – отклонение от средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате собственных исследований установлено, что у суточных утят доли тимуса покрыты соединительнотканной капсулой, от которой отходят трабекулы, делящие ее на дольки. В дольках четко выражена дифференциация на корковое и мозговое вещество (рис. 1). Корковое вещество расположено на периферии дольки, более темного цвета, представлено тимоцитами малых, средних и больших размеров. Последние располагаются преимущественно на периферии дольки, а малые и средние – без определенной локализации. Площадь коркового вещества составляет $1,76 \times 10^5 \text{ мкм}^2$, площадь мозгового – $1,05 \times 10^5 \text{ мкм}^2$, их соотношение – $1,68 \pm 0,11$ (табл.). В корковом веществе тимоциты располагаются компактно, плотно друг к другу, поэтому на гистосрезе оно выглядит темнее, чем мозговое. В мозговом веществе тимоциты располагаются менее плотно, хорошо заметны ретикулоэпителиальные клетки, составляющие строу органа. Выявляются тельца Гассалья, как в стадии формирования, так и зрелые (рис. 2), представляющие собой концентрически расположенные скопления эпителиоретикулоцитов с хорошо различимыми уплотненными ядрами и слабоацидофильной цитоплазмой. Преобладание площади коркового вещества над мозговым, наличие между ними четкой границы, выявление в мозговом

веществе телец Гассалья свидетельствует о том, что у суточных утят тимус является зрелым, сформировавшимся органом с активным синтезом тимопоэтинов и напряженным лимфопозом.

У 15-суточных утят контрольной и опытной групп отмечена тенденция увеличения площади коркового и мозгового вещества, причем у опытной птицы более интенсивно возрастает зона коркового вещества за счет пролиферации тимоцитов, а в мозговом веществе – более активное образование телец Гассалья, размеры которых незначительно выше в сравнении с контролем (табл.).

К 30-суточному возрасту у птиц обеих групп увеличиваются размеры долек, их форма в основном многоугольная, однако встречаются овальные и округлые, зачатую трабекулы долек не достигают центральных участков дольки, и они сливаются своими основаниями. Увеличение размеров долек происходит за счет роста площади коркового и мозгового вещества, однако у птиц опытной группы более интенсивно увеличивается корковое, а у контрольных – мозговое. Показатель отношения площади коркового и мозгового вещества у опытной птицы достоверно превышает таковой контроля. Размеры телец Гассалья и их количество в одной дольке в опытной группе также превалировали над аналогичными показателями контрольной группы ($p \leq 0,05$; табл.). Все это свидетельствует о более высоком функциональном напряжении тимуса у опытной птицы под действием селена.

В 45-суточном возрасте у утят опытной группы достоверно увеличился показатель корково-мозгового отношения в сравнении с предыдущим возрастом, преимущественно за счет расширения площади корковой зоны. У интактных утят площадь коркового вещества не изменилась, однако отмечена тенденция увеличения площади мозгового вещества, что в таком возрасте является признаком акцидентальной инволюции, связанной, вероятно, с началом смены ювенильного пуха на первичное перо. В дольках тимуса опытных утят отмечено более плотное насыщение мозгового вещества тельцами Гассалья, которые были достоверно крупнее таковых в контрольной группе (табл.). У птиц обеих групп в мозговом веществе встречаются тельца

	Средняя толщина перегородки, мкм		Количество телец Гассалья		Средний диаметр телец Гассалья, мкм	
	К	О	К	О	К	О
	2,12 ± 0,12		4,18 ± 0,33		6,58 ± 1,23	
	2,91 ± 0,13	2,76 ± 0,18	5,68 ± 0,25	6,18 ± 0,26	8,16 ± 2,23	8,78 ± 2,09
	2,72 ± 0,15	2,46 ± 0,18	6,92 ± 0,24	8,54 ± 0,56*	8,65 ± 0,23	9,37 ± 0,12*
	3,14 ± 0,21	3,65 ± 0,18	8,72 ± 0,31	10,47 ± 0,46*	9,34 ± 0,32	10,58 ± 0,66*
	3,23 ± 0,22	3,76 ± 0,21	8,83 ± 0,56	10,45 ± 0,40*	10,81 ± 0,38	12,40 ± 0,32*
	3,22 ± 0,18	3,09 ± 0,26	7,24 ± 0,31	8,86 ± 0,22*	10,59 ± 0,32	12,15 ± 0,18*
	3,84 ± 0,21	3,60 ± 0,19	7,13 ± 0,22	8,02 ± 0,19*	9,79 ± 0,19	11,37 ± 0,27*
	3,82 ± 0,13	3,54 ± 0,14	6,42 ± 0,32	7,83 ± 0,21*	9,58 ± 0,17	10,72 ± 0,10*
	4,67 ± 0,22	4,69 ± 0,19	6,23 ± 0,21	7,62 ± 0,30*	9,46 ± 0,18	10,70 ± 0,22*

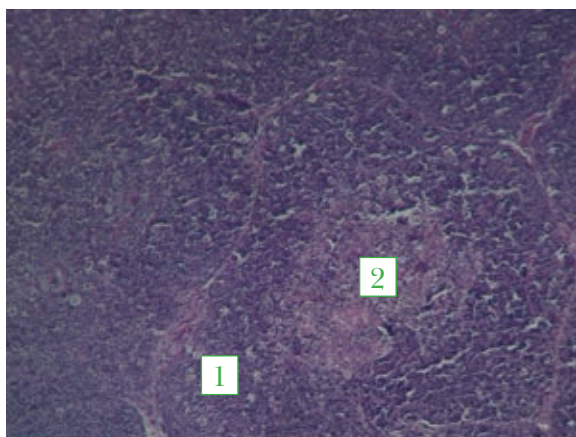


Рис. 1. Кортиковое (1) и мозговое (2) вещество тимуса суточных утят (окр. гематоксилин и эозин, ув. ×100)

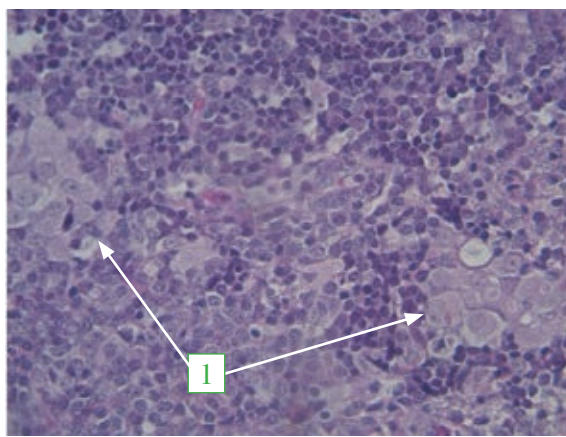


Рис. 2. Формирование телец Гассалья (1) в мозговом веществе суточных утят (окр. гематоксилин и эозин, ув. ×400)

Гассалья как молодые, формирующиеся, имеющие вид наслаивающихся друг на друга ближайших ретикуло-эпителиальных клеток, в цитоплазме которых накапливается слабоацидофильная бесструктурная масса, так и тельца в стадии морфофункциональной зрелости, состоящие из комплекса уплощенных наружных и дегенерирующих центральных клеток, а также кровеносных капилляров, которых было больше в опытной группе. По мнению ряда авторов [3, 8], тельца Гассалья выполняют в том числе эндокринную, иммуномодулирующую роль. Таким образом, под влиянием селена в тимусе подопытных утят отмечено нивелирование процессов акцидентальной инволюции, активнее протекают процессы синтеза тимопоэтинов и пролиферации тимоцитов.

Тенденция более высокой площади коркового вещества у опытной птицы, в сравнении с контролем, сохраняется и в 60-суточном возрасте. В контрольной группе граница между корковым и мозговым веществом размыта, в последнем содержатся тельца Гассалья различного размера и формы, однако в опытной группе преобладающими являются крупные, состоя-

щие из гипертрофированных ретикулоэпителиоцитов, ядра некоторых из них затушевывались и лизировались. Достоверно значимый, более высокий показатель отношения площади коркового и мозгового вещества, в сравнении с контролем, четкая граница между ними, преобладание в мозговом веществе зрелых форм телец Гассалья свидетельствуют о более высоком морфофункциональном статусе тимуса утят в опытной группе под влиянием селеноорганического препарата ДАФС-25к.

Тимус утят 75-суточного возраста контрольной группы продолжает демонстрировать признаки акцидентальной инволюции, пусковым механизмом которой является стресс-фактор, обусловленный разгаром линьки. Акцидентальная инволюция проявляется отсутствием четкой границы между корковым и мозговым веществом, обеднением обеих зон тимоцитами (рис. 3). Селен оказал положительное влияние на морфологию тимуса в опытной группе (рис. 4), что подтверждается более высоким показателем корково-мозгового отношения, четкой границей между ними, а также достоверно более высокими показателями количества и размеров телец Гассалья (табл.).

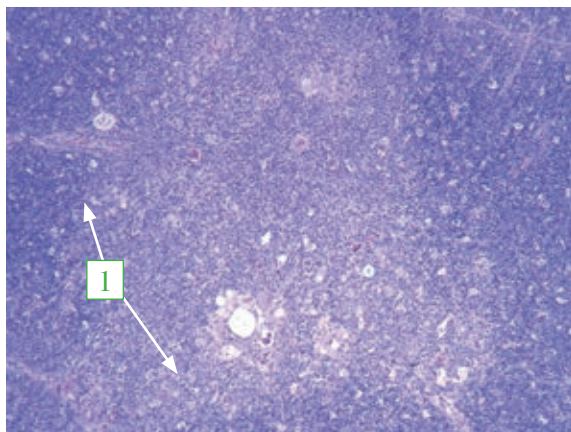


Рис. 3. Тимус 75-суточных утят контрольной группы. Признаки акцидентальной инволюции (1) (окр. гематоксилин и эозин, ув. $\times 200$)

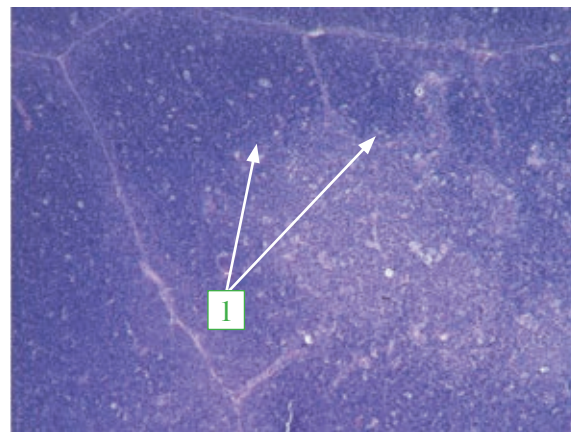


Рис. 4. Четкая граница (1) между корковым и мозговым веществом в тимусе 75-суточных утят опытной группы (окр. гематоксилин и эозин, ув. $\times 200$)

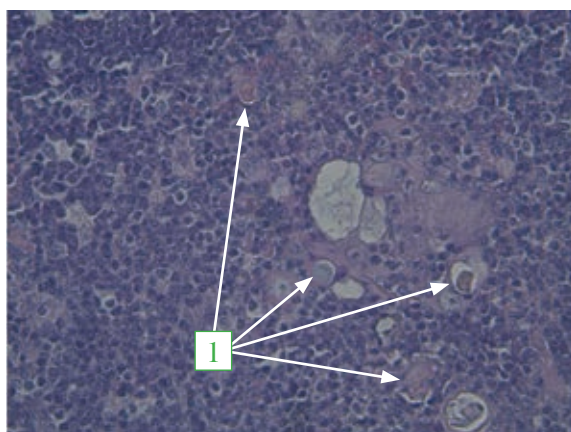


Рис. 5. Тельца Гассалья (1) в мозговом веществе тимуса 120-суточных утят контрольной группы (окр. гематоксилин и эозин, ув. $\times 400$)

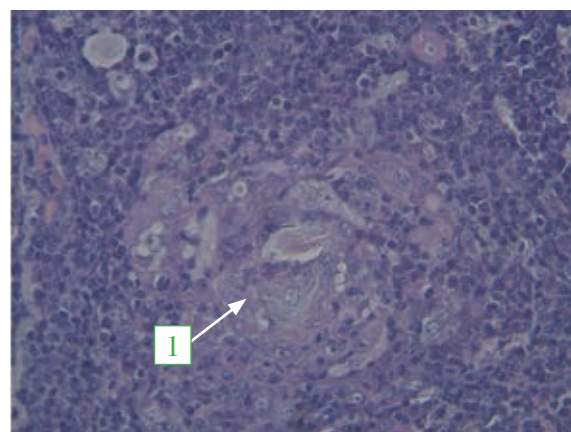


Рис. 6. Тельца Гассалья (1) в мозговом веществе тимуса 120-суточных утят опытной группы (окр. гематоксилин и эозин, ув. $\times 400$)

В 90-суточном возрасте в тимусе утят обеих групп отмечены инволютивные процессы, связанные с началом полового созревания, причем в контрольной группе, на фоне акцидентальной трансформации, они выражены ярче. Впервые за весь изучаемый период площадь мозгового вещества в этой группе преобладает над площадью коркового, что является результатом снижения пролиферации тимоцитов. В опытной группе селен предотвращает раннюю инволюцию, модулирует функциональную морфологию тимуса, вызывает умеренное иммуностимулирующее действие, что выражается в более высоких показателях корково-мозгового отношения, размеров и количества телец Гассалья, четкой границей между корковым и мозговым веществом. Более высокая плотность клеток корковой зоны тимуса свидетельствует об активно протекающих процессах пролиферации и дифференциации тимоцитов.

Тимус утят 105-суточного возраста контрольной группы характеризуется нарастанием процессов инволюции: граница между корковым и мозговым веществом размыта, площадь последнего преобладает над площадью коркового. Тельца Гассалья представлены в основном единично расположенными, округлой формы образованиями, состоящими из concentric

скоплений продолговатых и веретенообразных клеток с крупным ядром и слабоацидофильной цитоплазмой. У опытных утят этого возраста также происходит уменьшение площади коркового и мозгового вещества. В тимусе четко выражена граница между корковым и мозговым веществом, в котором преобладают крупные тельца Гассалья, представляющие собой конгломераты из двух-трех более мелких, слившихся между собой. На их периферии находятся функционально нормальные уплощенные эпителиальные, а в центре – дистрофически измененные клетки. Рядом с тельцами Гассалья выявляется большое количество кровеносных капилляров, к которым тесно примыкают стромальные эпителиальные клетки и окружают их с помощью своих отростков. По мнению ряда авторов, между эпителиальной мембраной и капиллярами находится периваскулярное пространство, заполненное тканевой жидкостью, содержащей лимфоциты, макрофаги и плазматические клетки. В результате формируется гематотимусный барьер между тканевыми структурами и кровеносным руслом тимуса. Именно этот барьер препятствует проникновению антигенов, являясь проницаемым для клеток лимфоидного ряда [3, 5]. Таким образом, под влиянием селена гистологическая карти-

на тимуса утят опытной группы свидетельствует о положительной динамике пролиферации тимоцитов, активной их миграции в тимусзависимые зоны иммунокомпетентных органов через богатую капиллярную сеть мозгового вещества.

В 120-суточном возрасте в тимусе утят обеих групп площадь мозгового вещества преобладает над площадью коркового, граница между ними не выявляется, отмечается тенденция к увеличению междольковых стромальных элементов, уменьшению количества и размеров телец Гассалья (рис. 5, 6). Несмотря на начало активного протекания процессов инволюции, связанного с началом полового созревания уток, тимус опытной птицы отличается более совершенной морфофункциональной структурой, способствующей стабилизации иммунного ответа, пролиферации и созревания тимоцитов.

ВЫВОДЫ

У суточных утят тимус является морфологически зрелым и активно функционирующим органом, характеризуется преобладанием коркового вещества над мозговым, четкой границей между ними, наличием телец Гассалья на разных стадиях формирования.

До 75-суточного возраста утят в тимусе отмечены процессы активной пролиферации тимоцитов, характеризующиеся более интенсивным увеличением площади коркового вещества, в сравнении с мозговым, формированием различной формы и размеров телец Гассалья, плотным расположением тимоцитов, что свидетельствует о высокой морфофункциональной напряженности тимуса.

С 90-суточного возраста в тимусе отмечают признаки возрастной инволюции, обусловленные началом полового созревания птицы, которые характеризуются уменьшением площади коркового вещества, стиранием границы между корковым и мозговым веществом, обеднением паренхимы тимоцитами, снижением количества и размеров телец Гассалья, тенденцией к расширению междольковых перегородок.

Использование в рационе утят селеноорганического препарата ДАФС-25к в дозе 1,3 мг/кг корма оказало положительное влияние. У опытных утят во все изучаемые возрастные периоды отмечена более высокая функциональная активность тимуса, выражающаяся в более значимых показателях отношения площади коркового и мозгового вещества, размеров и количества телец Гассалья, плотности тимоцитов. В опытной группе нивелированы процессы развития акцидентальной инволюции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гистологическая и гистохимическая оценка печени гусей китайской серой породы на фоне применения селеноорганического препарата ДАФС-25к / Д. А. Шишкина, В. В. Пронин, Е. Н. Вареник, Л. В. Фролова // Аграрный вестник Верхневолжья. – 2016. – № 1. – С. 59–60.
2. Данкверт С. А. Настоящее и будущее птицеводства // Птицеводство. – 2002. – № 3. – С. 4.
3. Красноперова М. А. Особенности клеточного состава коркового и мозгового вещества тимуса кур // Вестник Ижевской ГСХА. – 2014. – № 2 (39). – С. 26–28.
4. Сандул П. А., Луппова И. М., Сандул А. В. Морфофункциональная характеристика тимуса и фабрициевой бursы цыплят при введении в рацион Е-витаминных добавок // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2011. – Т. 47 (1). – С. 293–296.
5. Селезнев С. Б. Морфологические пути эволюции иммунной системы позвоночных // Нива Поволжья. – 2008. – № 1 (6). – С. 59–64.
6. Сквородин Е. Н., Давлетова В. Д., Дюдыбин О. В. Использование селеносодержащих препаратов при выращивании мускусных уток в зоне с недостатком селена // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. – № 4 (28). – С. 40–43.
7. Субботин А. М., Федотов Д. Н., Орда М. С. Закономерности возрастной структурной перестройки тимуса у перепелов, содержащихся на промышленной основе // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2012. – Т. 48 (2). – С. 171–173.
8. Якименко Л. Л. Морфофункциональные особенности телец Гассалья тимуса позвоночных // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2012. – Т. 48 (1). – С. 150–153.

REFERENCES

1. Histological and histochemical assessment of liver of grey Chinese geese during administration of organic selenium additive DAFS-25k. D. A. Shishkina, V. V. Pronin, Ye. N. Varenik, L. V. Frolova. *Agrarnyj vestnik Verhnevolzh'ja*. 2016; 1: 59–60 (in Russian).
2. Dankvert S. A. Present and future of poultry farming. *Pticevodstvo*. 2002; 3: 4 (in Russian).
3. Krasnopyorova M. A. Characteristics of cell composition of the cortical and brain substance of chicken thymus. *Vestnik Izhevskoj GSXA*. 2014; 2 (39): 26–28 (in Russian).
4. Sandul P. A., Luppova I. M., Sandul A. V. Morphofunctional evaluation of chicken thymus and bursa fabricii during dietary incorporation of E vitamin additives. *Uchenye zapiski UO VGAVM*. 2011; 47 (1): 293–296 (in Russian).
5. Seleznyov S. B. Morphological pathways in the evolution of immune system of vertebrates. *Niva Povolzh'ja*. 2008; 1 (6): 59–64 (in Russian).
6. Skovorodin Ye. N., Davletova V. D., Dyudbin O. V. Use of organic selenium-containing supplements for growing Muscovy ducks with selenium deficiency. *Vestnik APK Stavropol'ja*. 2017; 4 (28): 40–43 (in Russian).
7. Subbotin A. M., Fedotov D. N., Orda M. S. Regularities of the age-related structural rearrangement of the thymus in quails kept on an industrial basis. *Uchenye zapiski UO VGAVM*. 2012; 48 (2): 171–173 (in Russian).
8. Yakimenko L. L. Morphofunctional characteristics of Hassal's corpuscles of thymus of vertebrates. *Uchenye zapiski UO VGAVM*. 2012; 48 (1): 150–153 (in Russian).

Поступила 25.07.18

Принята в печать 02.08.18

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ИНДЕЕК ВИРУСОМ ГРИППА A/DUCK/ALTAI/469/14 H5N1

В. Ю. Сосипаторова¹, Д. А. Алтунин², И. А. Чвала³, Н. С. Мудрак⁴, Д. Б. Андрейчук⁵

¹Биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

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

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

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

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

РЕЗЮМЕ

Представлены данные по экспериментальному заражению 6-недельных индеек кросса Биг 6 эпизоотическим штаммом вируса гриппа A/duck/Altai/469/14 H5N1 (клада 2.3.2.1с). Для птиц, инокулированных интраназально в дозе $5,0 \text{ Ig ЭИД}_{50}/0,5 \text{ см}^3$, описаны особенности течения инфекционного процесса с указанием инкубационного периода и среднего времени гибели. Путем гистологического и иммуногистохимического исследований фрагментов органов респираторной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, нервной, выделительной, лимфоидной и мышечной систем подопытных особей показаны патоморфологические изменения в организме птиц на тканевом и клеточном уровне. Анализ проведен на парных препаратах парафиновых срезов тканей экспериментально зараженных и здоровых индеек. Один образец был подвержен гистологическому окрашиванию с применением красителей гематоксилин и эозин, а его дубликат – иммуногистохимическому анализу с использованием в качестве первичных антител препарата поликлональных антител против рибонуклеопротеина вируса гриппа птиц. Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования фотодокументированы и представлены в работе. Поражения в виде воспалений и некрозов различной степени тяжести выявлены в препаратах трахеи, легкого, мышечного желудка, железистого желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника, поджелудочной железы, головного мозга, мозжечка, сердца, почек, печени и селезенки индеек. Иммуногистохимический анализ показал наибольшее распространение антигена вируса гриппа в эндотелии сосудов головного мозга, нейронах Пуркинье мозжечка, в ацинарных клетках поджелудочной железы и в миокардиоцитах сердца. В ходе эксперимента было установлено, что вирус A/duck/Altai/469/14 H5N1 вызывал генерализованную форму инфекции у индеек с характерными для высокопатогенного гриппа клиническими и патологоанатомическими поражениями.

Ключевые слова: грипп птиц, H5N1, индейка, экспериментальное заражение, гистология, иммуногистохимия.

ВВЕДЕНИЕ

Высокопатогенный грипп птиц (ВГП), вызванный вирусом азиатской генетической линии (A/goose/Guangdong/1/1996 H5N1), получил эпизоотическое распространение и оказался способен вызывать заболевание различных видов птиц, а также млекопитающих. Циркулируя в популяции птиц, изоляты претерпевали значительные видоизменения и антигенные перестройки, в результате чего появилось 10 основных генетических групп вируса (0–9) и множество сублиний [6, 12].

Изоляты генетической клады 2.2, близкородственные вирусам, выделенным от водоплавающих птиц на озере Qinghai, вызывали вспышки болезни среди домашних и диких птиц в России в 2005–2007 гг. В 2008 г. в Приморском крае были выделены изоляты гриппа птиц A/H5N1 клады 2.3.2. Данная генетическая подгруппа получила распространение в Китае и Вьетнаме и дала начало ряду сублиний вируса [5, 7]. В России изоляты A/H5N1 клады 2.3.2.1 вызывали вспышки высокопатогенного гриппа в популяции диких птиц в Республике Тыва в 2009–2010 гг.

В 2014 г. при вспышках острой инфекции в частных птицеводческих хозяйствах Алтайского края впервые был выявлен новый реассортант ВГП сублинии 2.3.2.1с.

В 2015 г. очаги заболевания, вызванные вирусом A/H5N1 клады 2.3.2.1с, регистрировали в Сибирском и Южном регионах России среди птиц дикой фауны [5].

В мире изоляты данной генетической подгруппы в период с 2014 г. по настоящее время получили распространение в странах Юго-Восточной Азии, Западной Африки и Ближнего Востока, отмечены спорадические вспышки ВГП A/H5N1 в Западной Европе [6, 7]. При этом в течение 2017 г. и первой половины 2018 г. в Китае, Нигерии, Камеруне, Индии, Иране, Лаосе, Мьянме, Непале, Нигерии и Вьетнаме наблюдают социркуляцию штаммов вируса A/H5N1, A/H5N2, A/H5N3, A/H5N6 и A/H5N8, а также низкопатогенных подтипов гриппа птиц [5]. Такая эпизоотическая ситуация создает риск реассортации и мутации вируса, что может повлечь значительные изменения его биологических свойств.

Для России по-прежнему существует риск повторного заноса вируса A/H5N1 на территорию страны из эндемичных очагов по Восточно-Африканскому, Центральному и Восточно-Азиатскому пролетным путям диких птиц, что вызывает опасения среди ветеринарных служб и владельцев птицеводческих хозяйств.

Производство мяса индейки – это активно развивающаяся в нашей стране птицеводческая отрасль:

RESULTS OF EXPERIMENTAL INFECTION OF TURKEYS WITH A/DUCK/ALTAI/469/14 H5N1 STRAIN OF AVIAN INFLUENZA VIRUS

V. Yu. Sosipatorova¹, D. A. Altunin², I. A. Chvala³, N. S. Mudrak⁴, D. B. Andreychuk⁵

¹Biologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

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

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

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

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

SUMMARY

The data on experimental infection of 6-week-old Big-6 cross turkeys with an epidemic A/duck/Altai/469/14 H5N1 clade 2.3.2.1c strain of avian influenza virus are presented. The characteristics of the infection process in birds inoculated intranasally at a dose of $5.0 \lg \text{EID}_{50}/0.5 \text{ cm}^3$ are described with an indication of the incubation period and the mean time of death. The pathomorphological changes at the tissue and cellular level are shown based on histological and immunohistochemical studies of fragments of respiratory, digestive, cardiovascular, nervous, excretory, lymphoid and muscular systems of experimental birds. The testing was carried out using paired preparations of paraffin-embedded tissue sections from experimentally infected and healthy turkeys. One sample was subjected to histological staining using hematoxylin and eosin dyes, and its duplicate was subjected to immunohistochemical assay using a preparation of polyclonal antibodies as primary antibodies against the ribonucleoprotein of avian influenza virus. The results of histological and immunohistochemical studies are photodocumented and presented in the paper. Inflammatory and necrotic lesions of varying severity are detected in the preparations of the trachea, lung, muscular stomach, glandular stomach, small intestine, large intestine, pancreas, brain, cerebellum, heart, kidneys, liver and spleen of turkeys. Immunohistochemical analysis showed the greatest distribution of the influenza virus antigen in the cerebral endothelium, cerebellar Purkinje neurons, acinar cells of the pancreas and in myocardiocytes of the heart. In the course of the experiment it was established that A/duck/Altai/469/14 H5N1 caused a generalized form of infection in turkeys with clinical and pathologic lesions characteristic of highly pathogenic avian influenza.

Key words: avian influenza, H5N1, turkey, experimental infection, histology, immunohistochemistry.

в 2017 г. товарное производство мясной продукции оценивалось в 222 тыс. т в убойном весе, к 2020 г. ожидается рост указанного показателя до 485 тыс. т [1]. При этом данный вид птиц очень восприимчив к вирусу А/Н5 [4, 8, 11, 13]. Так, в конце 2016 – начале 2017 г. в Ростовской области при вспышках ВГП А/Н5Н8 было уничтожено более 500 тыс. голов индеек [5].

Научный и практический интерес представляет изучение особенностей течения ВГП у индеек, вызванного изолятом А/Н5Н1 современной генетической подгруппы 2.3.2.1c A/duck/Altai/469/14 H5N1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали изолят вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1, выделенный из образцов биологического материала от домашней утки, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из Алтайского края в 2014 г. Вирусовыделение проводили в 10-суточных эмбрионах кур, свободных от патогенной микрофлоры (СПФ-КЭ). Из биологического материала готовили 10–20%-ю суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4) и вводили в аллантоисную полость КЭ в объеме $0,2 \text{ см}^3$. От эмбрионов, погибших после 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную

жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований. Для заражения индеек использовали вирусный материал, полученный после 2-го пассажа в 10-суточных СПФ-КЭ.

Экспериментальное заражение индеек. Неиммунных к вирусу гриппа птиц 6-недельных индеек кросса Биг 6 разделили на три группы: 1 – «наблюдение патологического процесса» (10 голов), 2 – «исследование патоморфологических изменений» (17 голов), 3 – «контроль» (6 голов). Индеек содержали в изолированных боксах со свободным доступом к корму и воде. Экспериментальное заражение птиц 1-й и 2-й групп проводили интраназально в объеме $0,25 \text{ см}^3$ в каждый носовой ход в дозе $5,0 \lg \text{EID}_{50}/0,5 \text{ см}^3$. Птицам контрольной группы вводили ЭЭЖ от СПФ-КЭ аналогичным способом. Длительность опыта составила 5 сут, на протяжении которых осуществляли ежедневный клинический осмотр птиц, проводили вскрытие павших особей.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование. В ходе эксперимента от павших, убитых с диагностической целью и незараженных вирусом гриппа птиц индеек отбирали образцы внутренних органов: трахеи, легкого, мышечного желудка, железистого желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника,

поджелудочной железы, мозга, мозжечка, сердца, почек, печени, селезенки и скелетных мышц размером 0,5 см³. Препараты фиксировали в смеси спирт-формол по Шафферу, через 48 ч осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки. С помощью ротационного микротома Microm HM340E готовили парные срезы тканей органов индеек толщиной 5 мкм. Один из препаратов подвергали окраске гематоксилин-эозином (Г-Э), другой – иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию. Подготовку образцов срезов к ИГХ-окрашиванию осуществляли по схеме, представленной в предыдущем исследовании, с некоторыми модификациями [2].

Этапы реакции осуществляли согласно протоколу к набору Reveal Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, США) для ИГХ-исследования тканей. В качестве первичных антител использовали очищенную фракцию иммуноглобулинов G (IgG) сыворотки крови кролика против rNP вируса гриппа типа А.

Результаты ИГХ-реакции оценивали в крестах:

- антиген (Ag) вируса не обнаружен;
- + выявлены единичные очаги Ag вируса;
- ++ несколько очагов скопления Ag вируса;
- +++ множественные очаги скопления Ag вируса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения патогенеза инфекции у индеек, вызванной вирусом гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1, за птицей был установлен ежедневный клинический контроль. В экспериментальной группе 1 каждой особи был присвоен порядковый номер с целью выявления

особенностей течения болезни и последующего расчета среднего времени гибели (MDT) [8].

На протяжении эксперимента ежедневно по одной птице из контрольной группы 3 подвергали диагностическому убою, проводили патологоанатомическое вскрытие и отбирали внутренние органы для последующей сравнительной оценки.

Клинические симптомы заболевания появились у индеек через 2 сут после введения вируса. Птицы были угнетены, некоторые стояли с опущенными вниз крыльями (парез). У половины индеек были слизистые истечения из носа, одышка, диарея с выделениями бело-желтого цвета (рис. 1, I).

Через 3 сут после начала эксперимента наблюдали выраженное нарушение систем кровообращения у подопытных особей: у 8 из 10 птиц, в том числе погибших, отмечали цианоз лап и шеи (рис. 1, II).

Развитие симптомов поражения нервной системы различной степени тяжести в виде дискоординации движений, треморов, парезов, нистагма глаз наблюдали у 7 из 10 индеек через 3–4 сут после заражения.

Эксперимент закончился через 5 сут после инокуляции индеек вирусом гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1, в результате чего погибли все подопытные особи. Инкубационный период инфекции составил 2 сут, расчетное значение MDT – 3,8 сут.

Патологоанатомическое вскрытие павших и убитых в диагностических целях птиц показало следующие изменения внутренних органов: спленомегалия, геморрагический и экссудативный диатез множества внутренних органов, миокардиодистрофия и гидроперикардит,

Рис. 1. Клиническое состояние и патологоанатомические изменения внутренних органов индеек экспериментальной группы 1

I – взъерошенность оперения, опущенные вниз крылья (парез); II – цианоз лап; III – гидроперикардит; IV – кровоизлияния в поджелудочной железе.



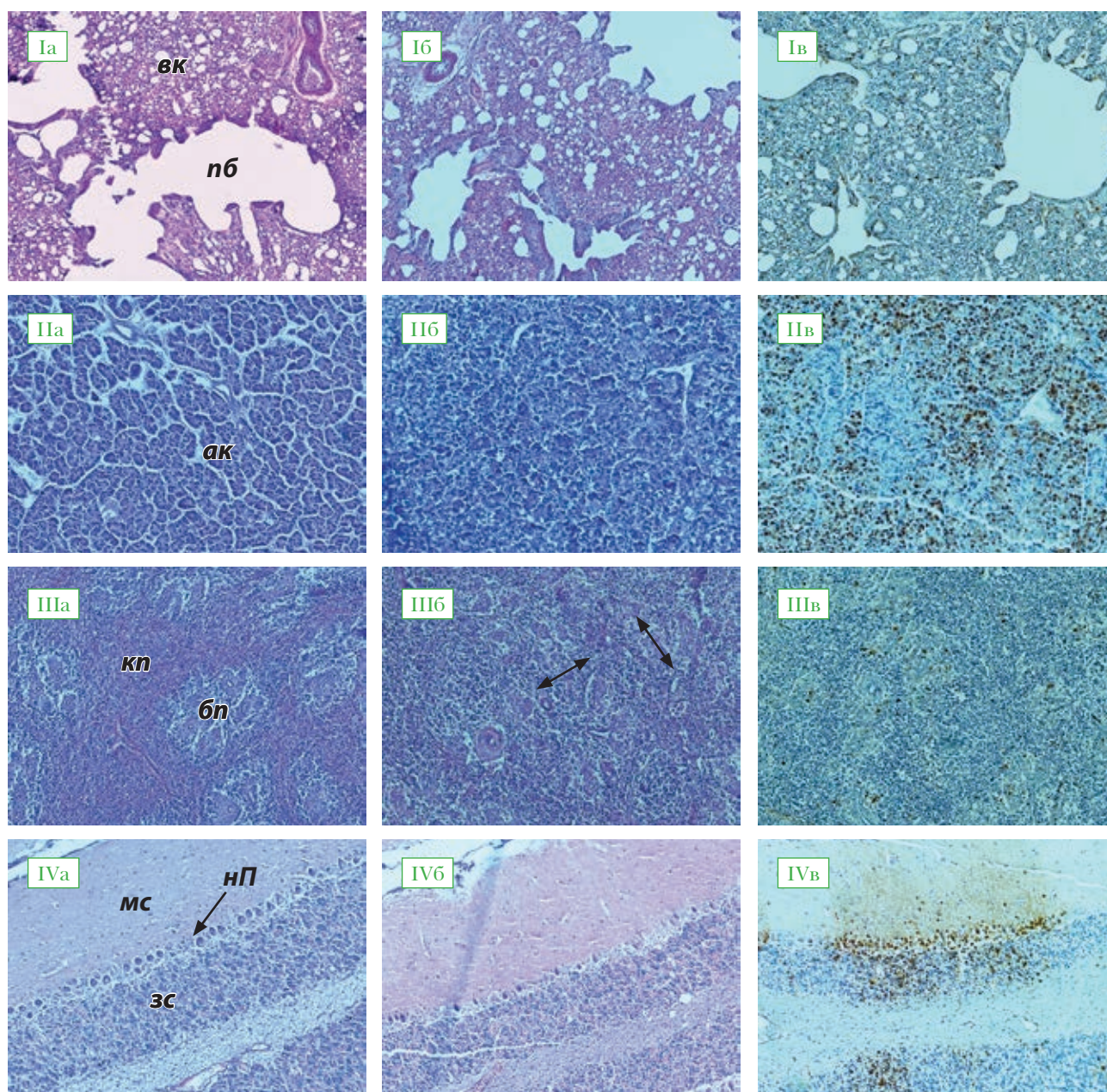


Рис. 2. Микрофотографии препаратов тканей индеек (3 сут эксперимента, увеличение $\times 100$)

I – легкие: пб – парабронх; вк – воздухоносные капилляры;
II – поджелудочная железа: ак – ацинарные клетки;
III – селезенка: бп – белая пульпа; кп – красная пульпа;
 ↓ – область некроза;
IV – мозжечок: мс – молекулярный слой; зс – зернистый слой; нП – нейроны Пуркинье;
 а – контрольная группа, окраска Г-Э;
 б – опытная группа, окраска Г-Э;
 в – ИГХ-окрашивание ДАБ-гематоксилином.

кровенеполненность легких, нефрит, крупноочаговые кровоизлияния в поджелудочной железе, катаральное воспаление желудка и кишечника (рис. 1, III–IV).

Результаты предыдущих исследований об экспериментальном заражении некоторых видов птиц отряда курообразные изолятами гриппа птиц A/H5N1, выде-

ленными на территориях Евразии и Африки в 2007–2012 гг., показали, что во всех случаях заболевание протекало стремительно с высокой летальностью для кур, индеек и перепелов (MDT – от 2 до 6 сут) [3, 4, 8–13]. Клиническая картина и тяжелые поражения внутренних органов сопоставимы с результатами данного исследования, однако цианоз неоперенной части кожи в опубликованных работах отмечен не был.

В опытной группе 2 осуществляли отбор образцов внутренних органов от заболевших и погибших птиц – тканей респираторной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, нервной, выделительной, лимфоидной и мышечной систем – начиная с первых суток после заражения. Для анализа патоморфологических изменений использовали не менее двух особей.

Гистологический анализ тканей индеек опытной группы 2 показал изменения во всех системах органов птиц, в наибольшей степени в кровеносной, нервной и пищеварительной. Поражения тканей представлены

Таблица
Результаты ИГХ-исследований тканей индеек, зараженных вирусом гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1

Вид ткани	Локализация Аг вируса гриппа птиц	Концентрация Аг вируса гриппа птиц (ИГХ)
Респираторный тракт		
Трахея	Очаги геморрагий подслизистого слоя	+
Легкие	Стенки парабронхов и воздухоносных капилляров (рис. 2, IVв)	++
Пищеварительная система		
Железистый желудок	Эпителий кишечных желез	+
Поджелудочная железа	Ацинарные клетки (рис. 2, IVв)	+++
Тонкий кишечник	Эпителий ворсинок, просвет либеркуловых желез	++
Печень	Гепатоциты, эндотелий сосудов	+
Выделительная система		
Почки	Эпителий дистальных канальцев	+
Сердечно-сосудистая система		
Сердце	Кардиомиоциты	++
Лимфоидные органы		
Селезенка	Эндотелий лимфатических сосудов (рис. 2, IIIв)	++
Нервная система		
Мозжечок	Клетки Пуркинье (рис. 2, IVв)	+++
Мозг	Эндотелий сосудов	++
Скелетные мышцы	Распространение Аг не отмечено	—

некрозами различной степени тяжести и воспалении.

Респираторный тракт. В трахеях выявляли очаговые геморрагии за счет инфильтрации эритроцитов в слизистую и подслизистую оболочки. В легких отмечали умеренный ателектаз воздухоносных капилляров (рис. 2, IVб).

Пищеварительная система. В железистом желудке просвет подслизистых кишечных желез сужен, в междольковом пространстве наблюдали очаги пролиферации лимфоцитов. В основании ворсинок тонкого кишечника выявляли очаги воспалительно-клеточной инфильтрации, в апикальной части – вакуолизацию эпителиальных клеток. В препарате поджелудочной железы регистрировали обширные области коагуляционного некроза эпителия ацинарных клеток (рис. 2, IVб).

Выделительная система. В почках наблюдали дилатацию почечных канальцев, некроз почечных телец с выходом наружу эритроцитов.

Сердечно-сосудистая система. В сердце отмечали дистрофию миокарда, обширные области некроза кардиомиоцитов, лимфоцитарно-плазмочитарный инфильтрат.

Лимфоидные органы. Области белой и красной пульпы селезенки почти неразличимы ввиду множественных очагов некробиоза клеток лимфоидного ряда (рис. 2, IIIб).

Нервная система. В ткани головного мозга регистрировали вакуолизацию нейропилия, периваскуляр-

ный отек. В мозжечке отмечали некроз нейронов Пуркинье, встречали области геморрагий в молекулярном и зернистом слоях (рис. 2, IVб).

Выявленные поражения четко коррелировали с распространением Аг вируса гриппа птиц в образцах. В таблице представлены данные о локализации и концентрации Аг вируса гриппа птиц в исследуемых тканях индеек.

Наибольшее распространение Аг вируса гриппа птиц представлено в эндотелии сосудов головного мозга, нейронах Пуркинье мозжечка, в ацинарных клетках поджелудочной железы и в миокардиоцитах сердца.

Выявленные в исследовании патоморфологические изменения сопоставимы с результатами работ предыдущих лет по экспериментальным заражениям птиц отряда курообразные (*Galliformes*).

В 2015 г. при интраназальном введении вирусной суспензии изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 8-недельным цыплятам наблюдали схожую картину поражения тканей с локализацией Аг гриппа птиц в мозжечке, тонком кишечнике и трахее [2].

Экспериментальные данные И. В. Бахчина и соавт. (2014) по заражению 8-недельных цыплят вирусом A/grebe/Tuva/433/10 H5N1 (клада 2.3.2.1) показали размножение патогена преимущественно в тканях легких и в кишечнике кур [3].

В работе K. Bertran и соавт. (2013) при инокуляции 8-недельных перепелов вирусом A/grebe/Basque Country/06.03249/2006 H5N1 высокую концентрацию

Аг и соответствующие изменения регистрировали в тканях нервной, пищеварительной и сердечно-сосудистой систем [9].

Таким образом, высокая вирулентность вируса гриппа А/Н5N1 для курообразных остается важным биологическим свойством вируса на протяжении ряда лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволили сделать заключение, что вирус A/duck/Altai/469/14 H5N1 вызывает острую генерализованную форму инфекции у индеек с характерными для высокопатогенного гриппа клиническими и патологоанатомическими поражениями.

Иммуногистохимическое исследование показало накопление патогена в эндотелии сосудов, в клетках висцеральных органов, а также в ткани мозжечка и полушарий головного мозга. Распространение антигена вируса в наибольшей концентрации наблюдали в очагах некроза и воспаления пораженных тканей нервной, сердечно-сосудистой и пищеварительной систем.

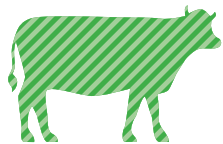
Результаты представленного научного исследования по заражению индеек вирусом A/duck/Altai/469/14 H5N1 азиатской группы дополняют существующие литературные данные по изучению патобиологии природных изолятов гриппа птиц и показывают стабильно высокую патогенность клады 2.3.2.1с для данного вида птиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганенко И., Белая А. Производство индейки по итогам 2017 года сократится на 2% // Агроинвестор. Рынки. Новости. – 2017. – URL: <http://www.agroinvestor.ru/markets/news/28938-proizvodstvo-indeyki-po-itogam-2017-goda-sokratitsy/>.
2. Изучение особенностей патологического процесса у кур, вызванного изолятом вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1 / В. Ю. Сосипаторова, Д. А. Алтунин, М. А. Циванюк, И. А. Чвала // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1 (16). – С. 51–54.
3. Патоморфологические изменения у кур при экспериментальном заражении вирусом гриппа птиц А/Н5N1 / И. В. Бахчин, И. А. Чвала, М. А. Волкова [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2014. – № 1 (68). – С. 47–51.
4. Показатели летальности при экспериментальной и естественной инфекции, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа H5N1 / А. В. Зайковская, С. А. Леонов, Ю. Г. Юшков [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 5 (87), ч. 1. – С. 224–227.
5. Animal Health in the Word. Avian Influenza Portal / OIE. – URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/>.
6. Enhanced virulence of clade 2.3.2.1 highly pathogenic avian influenza A H5N1 viruses in ferrets / M. B. Pearce, C. Pappasa, K. M. Gustina [et al.] // Virology. – 2017. – Vol. 502. – P. 114–122; doi: 10.1016/j.virol.2016.12.024.
7. Highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.2.1 and clade 2.3.4 viruses do not induce a clade-specific phenotype in mallard ducks / M. Ducatez, S. Sonnberg, J. C. Crumpton [et al.] // J. Gen. Virol. – 2017. – Vol. 98, No. 6. – P. 1232–1244; doi: 10.1099/jgv.0.000806.
8. Infection dynamics of highly pathogenic avian influenza and virulent avian paramyxovirus type 1 viruses in chickens, turkeys and ducks / E. W. Aldous, J. M. Seekings, A. McNally [et al.] // Avian Pathol. – 2010. – Vol. 39, No. 4. – P. 265–273; doi: 10.1080/03079457.2010.492825.
9. Pathobiology and transmission of highly and low pathogenic avian influenza viruses in European quail (Coturnix c. coturnix) / K. Bertran, R. Dolz, N. Busquets [et al.] // Vet. Res. – 2013. – Vol. 44 (1); 23; doi: 10.1186/1297-9716-44-23.
10. Pathogenicity and transmission of H5N1 avian influenza viruses in different birds / R. Yuan, J. Cui, S. Zhang [et al.] // Vet. Microbiol. – 2014. – Vol. 168, No. 1. – P. 50–59; doi: 10.1016/j.vetmic.2013.10.013.
11. Pathological findings of highly pathogenic avian influenza virus A/Duck/Vietnam/12/2005 (H5N1) in Turkeys / M. J. Mehrabanpour, H. Dadras, A. Khodakaram-Tafti [et al.] // Intern. J. Poultry Sci. – 2007. – Vol. 6, No. 9. – P. 679–683; doi: 10.3923/ijps.2007.679.683.
12. Phylogenetic and pathogenic analyses of three H5N1 avian influenza viruses (clade 2.3.2.1) isolated from wild birds in Northeast China / Z. Fan, Y. Ci, L. Liu [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2015. – Vol. 29. – P. 138–145; doi: 10.1016/j.meegid.2014.11.020.
13. Protective efficacy of H5 inactivated vaccines in meat turkey poult after challenge with Egyptian variant highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. W. H. Kilany, E. M. Abdelwhab, A. S. Arafa [et al.] // Vet. Microbiol. – 2011. – Vol. 150, No. 1–2. – P. 28–34; doi: 10.1016/j.vetmic.2010.12.016.

Поступила 25.07.18

Принята в печать 16.08.18



ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ НЕПРЯМОГО «СЭНДВИЧ»-ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО (НОДУЛЯРНОГО) ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

О. А. Рябикина¹, В. И. Диев², О. П. Бьядовская³, А. В. Константинов⁴, С. К. Старов⁵, А. В. Кононов⁶, В. Ю. Кулаков⁷, О. Н. Петрова⁸

¹ Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ryabikina@arriah.ru

² Доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: diev@arriah.ru

³ И. о. заведующего лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

⁴ Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: konstantinov@arriah.ru

⁵ Заместитель директора, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: starov@arriah.ru

⁶ Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononov@arriah.ru

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

⁸ Заведующий сектором, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: petrova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота является экономически значимым заболеванием, поскольку приводит к снижению привесов и молочной продуктивности, абортам, маститам, нарушению функции воспроизводства, поражению органов дыхания, истощению животных, а в отдельных случаях – их гибели. В настоящее время болезнь включена в список МЭБ и подлежит обязательной нотификации. Возникновение и распространение заболевания на территории Российской Федерации обусловило необходимость проведения исследований в рамках совершенствования методов лабораторной диагностики. Впервые в России разработана тест-система на основе непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа для диагностики заразного узелкового (нодулярного) дерматита крупного рогатого скота, позволяющая в течение 24 часов провести исследование биоматериала. Разработка тест-системы включала в себя получение специфических антител от лабораторных животных (кролики и морские свинки), подбор оптимального разведения улавливающих и детекторных антител, состава буферных растворов и условий постановки реакции. С использованием разработанной методики исследовано 50 образцов исходных культуральных антигенов вируса заразного узелкового дерматита, а также вирусосодержащих суспензий, отобранных на различных этапах очистки и концентрирования. Для подтверждения результатов ИФА все исследованные пробы были тестированы методом ПЦР-РВ. Кроме того, для всех исследуемых материалов определяли титр инфекционной активности вируса методом титрования в культуре клеток ЯДК-04. Диагностическая специфичность теста составила 100%, а аналитическая чувствительность – 3,5 Ig ТЦД₅₀. Разработанный «сэндвич»-вариант ИФА позволяет тестировать одновременно в формате 96-луночного планшета до 24 проб антигена в разведении 1:2–1:16 и может быть использован для диагностики заразного узелкового (нодулярного) дерматита крупного рогатого скота.

Ключевые слова: заразный узелковый дерматит, иммуноферментный анализ, тест-система, крупный рогатый скот.

ВВЕДЕНИЕ

Заразный узелковый (нодулярный) дерматит (кожная бугорчатка, узелковый дерматит, кожно-узелковая сыпь, болезнь «кожного отека» у буйволов, «лоскутная» болезнь кожи, вирусная заразная бугорчатка кожи, узелковая экзантема) – болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узелков (бугров), поражением глаз и слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов [2, 5].

Возбудителем является ДНК-содержащий вирус (лат. – *Dermatitis nodularis bovum*; англ. – Lumpy skin disease virus). В соответствии с классификацией, установленной Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy

of Viruses), относится к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*.

Заболевание проявляется в теплое время года, в период биологической активности кровососущих насекомых, быстро распространяется и протекает в виде энзоотии и эпизоотии [2, 9].

Заразный узелковый дерматит (ЗУД КРС) наносит значительный ущерб животноводству, обусловленный снижением привесов, молочной продуктивности, истощением животных, а в отдельных случаях – их гибелью.

Наличие ЗУД КРС в различные годы регистрировалось в Израиле, Ливане, Бахрейне, Кувейте, Омане, Йемене, Палестине, Иране, Ираке, Египте, Сирии, Турции и Азербайджане. В Европе возникновение заболевания отмечено в Греции, Болгарии, Македонии, Косове.

TEST-SYSTEM BASED ON INDIRECT "SANDWICH" ELISA TO DETECT THE LUMPY SKIN DISEASE VIRUS ANTIGEN

O. A. Ryabikina¹, V. I. Diev², O. P. Byadovskaya³, A. V. Konstantinov⁴, S. K. Starov⁵, A. V. Kononov⁶, V. Yu. Kulakov⁷, O. N. Petrova⁸

¹ Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ryabikina@arriah.ru

² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: diev@arriah.ru

³ Interim Head of the Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: byadovskaya@arriah.ru

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

⁵ Deputy Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: starov@arriah.ru

⁶ Head of the Department, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kononov@arriah.ru

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

⁸ Head of the Sector, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: petrova@arriah.ru

SUMMARY

Lumpy skin disease is an economically significant disease as it results in decrease in weight gain and milk yield, abortions, mastitis, reproduction disorders, animal emaciation, lesions of respiratory organs and in some cases – death. Today the disease is included in the OIE list and is subject to obligatory notification. The emergence and spread of the disease in the Russian Federation necessitated performance of tests in the framework of laboratory diagnosis method improvement. The test-system based on the indirect "Sandwich" ELISA for diagnosis of lumpy skin disease allowing performance of biomaterial tests within 24 hours was for the first time developed in Russia. The test-system development included antibody preparation in laboratory animals (rabbits and guinea pigs), selection of optimal dilution of capture and detection antibodies, composition of a buffer solution and conditions of the reaction procedure. 50 samples of initial culture antigens of the lumpy skin disease virus as well virus-containing suspensions collected on different stages of purification and concentration were tested using this technique. To confirm the ELISA results all analyzed samples were tested using RT-PCR. Besides, the virus infectivity titer was determined by titration in YaDK-04 (Goat gonad cells). The test specificity was 100%, and analytical sensitivity – 3.5 lg TCD₅₀. The developed "Sandwich" ELISA allows performing tests of 24 antigen samples at 1:2–1:16 dilution simultaneously using 96-well plate and it can be used for lumpy skin disease diagnosis.

Key words: lumpy skin disease, ELISA, test-system, cattle.

В 2017 г. неблагополучными по этому заболеванию были 19 стран (рис. 1).

В 2015 г. на территории Российской Федерации в Республике Дагестан установлено заболевание ЗУД КРС, которое в дальнейшем имело распространение среди крупного рогатого скота различных регионов (рис. 2).

В настоящее время болезнь включена в список МЭБ и подлежит обязательной нотификации [2]. Заразный узелковый дерматит КРС отсутствует в Перечне заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин), утвержденном приказом Минсельхоза РФ № 476 от 19 декабря 2011 г.

Диагноз ставят на основании анализа эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических и гистологических изменений, а также результатов лабораторных исследований. Выявление возбудителя ЗУД КРС в пробах биоматериала проводится комплексно, с применением ряда методов: реакции иммунофлюоресценции, реакции иммунодиффузии в агаровом геле, вестерн-блоттинга, вирус выделения с использо-

ванием чувствительной культуры клеток и др., которые достаточно трудоемки и длительны по времени постановки [1, 2, 6–8].

В связи с возникновением и распространением ЗУД КРС на территории Российской Федерации возникла необходимость проведения исследований в рамках совершенствования методов лабораторной диагностики.

Целью работы была разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса ЗУД КРС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В состав тест-системы ИФА входят: культуральный положительный антиген вируса ЗУД (нодулярного дерматита) КРС штамма «Э-95», адаптированный в перевиваемой культуре клеток яичников домашней козы (ЯДК-04), с титром инфекционной активности 5,5 lg ТЦД₅₀/см³; культуральный отрицательный нормальный антиген; улавливающие антитела – специфическая гипериммунная поликлональная сыворотка кролика; детекторные антитела – специфическая



Рис. 1. Распространение заболевания в мире

гипериммунная поликлональная сыворотка морской свинки; антивидовой конъюгат – иммуноглобулины против IgG морской свинки, конъюгированные с пероксидазой хрена; 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер (pH 9,5–9,6) для разведения антигена; трис-буферный раствор (ТБР) (pH 7,4–7,6); промывочный буферный раствор ТБР с Твином-20 (ТБР-Т), Твин-20 (0,1%-й раствор); блокирующий буферный раствор (pH 7,4–7,6), на основе 10%-го раствора сухого молока; буфер для разведений проб и конъюгата; раствор 2,2-азино-ди-(3-этилбензоаминосальфоната); раствор, останавливающий окраску, – 1%-й раствор додецилсульфата натрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод твердофазного непрямого «сэндвич»-варианта ИФА основан на взаимодействии исследуемого антигена вначале с адсорбированными на поверхности улавливающими антителами (специфическая поликлональная сыворотка кролика), а затем с детекторными антителами (специфическая поликлональная сыворотка крови морской свинки). Образовавшийся иммунный комплекс выявляли с помощью антител против IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена, и хромогенного субстрата.

Разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА включала в себя получение специфических антител от лабораторных животных (кролики и морские свинки), подбор оптимального разведения улавливающих и детекторных антител, состава буферных растворов и условий постановки реакции.

Для получения специфических сывороток крови лабораторных животных использовали очищенный и концентрированный антиген вируса ЗУД КРС. Куль-

туральную жидкость, содержащую вирус, очищали от балластных белков и фрагментов клеток низкоскоростным центрифугированием при 4800 g в течение 40 мин, далее полученную надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч 40 мин при 45 000 g. Осадок, образовавшийся после центрифугирования, растворяли в 10 mM трис-HCl с 100 mM NaCl и 1 mM ЭДТА (TNE) буферном растворе и подвергали дальнейшему центрифугированию через слой 30%-й сахарозы при 106 000 g в течение 2,5 ч. Полученный осадок ресуспендировали в буферном растворе TNE в объеме 1/250 от первоначального, таким образом концентрируя в 250 раз. Антиген фасовали в криопробирки и хранили до использования при температуре –80 °C.

Для оценки специфичности очищенного вирусного антигена проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Нуклеиновую кислоту выделяли из 100 мкл исследуемого биологического материала с помощью набора для выделения «РИБО-сорб» («НекстБио», г. Москва) согласно инструкции изготовителя. Постановку ПЦР-РВ проводили в соответствии с методическими указаниями [4].

Все тестируемые в ПЦР-РВ образцы антигенов вируса имели пороговое значение (Ct) меньше 35 и были в диапазоне от 17 до 23, что свидетельствует о высоком содержании вируса в препаратах (рис. 3).

Концентрацию белка в препаратах антигена вируса ЗУД КРС измеряли по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина [2], она составила 0,5–1,0 мг/мл. Очищенный и концентрированный вирусный антиген был использован для получения специфических компонентов: гипериммунных сывороток кролика и морской свинки,



Рис. 2. Распространение заболевания в Российской Федерации

используемых в качестве улавливающих и детекторных антител в ИФА.

Рабочее разведение компонентов определяли в предварительных опытах путем постановки непрямого и прямого вариантов ИФА по блок-схеме («шахматный» порядок постановки). Реакцию ставили методом последовательных разведений начиная с разведения 1:2, внося по 100 мкл соответствующих разведений антигена в лунки полистиролового планшета (Nunc MaxiSorp, Дания) с предварительно адсорбированными в них улавливающими антителами. Затем связавшийся антиген выявляли с помощью детекторных антител. Все компоненты реакции добавляли в объеме 100 мкл, инкубировали при температуре 37 °С. Для иммобилизации улавливающих антител использовали 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер (pH 9,5–9,6). Тестируемые и контрольные пробы, детекторные антитела, антивидовой конъюгат разводили в 1 М трис-HCl с 0,15 М NaCl буферном растворе, содержащем 0,05% Твин-20 и 1% сухого молока. Этот же буфер, но без добавления сухого молока применяли для межэтапных промывок. В качестве субстрата использовали готовый раствор ABTC (Sigma). Реакцию останавливали добавлением 1%-го раствора додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм на ИФА-ридере Sunrise (Tecan, Австрия). Результат учитывали, регистрируя оптическую плотность (ОП) при длине волны 405 нм.

Титром антигена в испытуемом образце считали его последнее разведение, в котором величина ОП двукратно превышала ОП отрицательного контроля (реакция с нормальным антигеном).

Оптимальные разведения детекторных антител и антивидового конъюгата, определенные в пря-

мом варианте ИФА, составили соответственно 1:3000 и 1:500; рабочее разведение улавливающих антител, определенное путем постановки непрямого «сэндвич»-варианта ИФА, – 1:4000.

С использованием разработанной методики исследовано 50 образцов исходных культуральных антигенов вируса ЗУД КРС, а также вирусосодержащих суспензий, отобранных на различных этапах очистки и концентрирования. Для подтверждения результатов ИФА все исследованные пробы были тестированы методом ПЦР-РВ. Кроме того, для всех исследуемых материалов определяли титр инфекционной активности вируса методом титрования в культуре клеток ЯДК-04. Результаты частично представлены в таблице 1.

В результате изучения специфической активности установлено, что вируссодержащие материалы (ЗУД КРС) были положительными в ИФА и имели титр в пределах 1:4–1:32 (табл. 1). Все пробы с титром инфек-

Рис. 3. Результаты выявления генома вируса ЗУД КРС в ПЦР-РВ

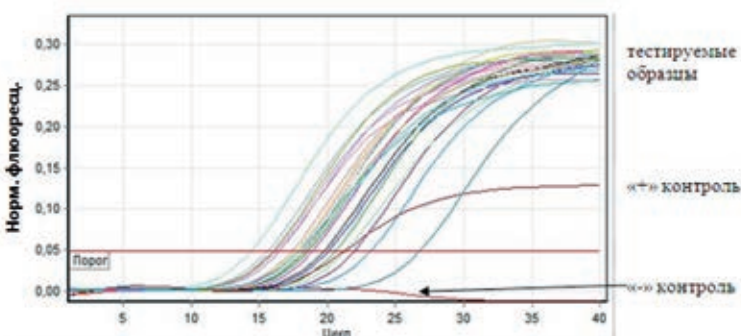


Таблица 1

Результаты выявления в ИФА антигена ЗУД КРС в вирусосодержащих суспензиях

n = 3

Характеристика исследуемого материала	Титр инфек. активности вируса, ТЦД ₅₀ /см ³	ПЦР-РВ	Непрямой «сэндвич»-вариант ИФА	
			титр	результат
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 1 пас.	4,75	полож.	1:8	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 1 пас.	5,5	полож.	1:32	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 2 пас.	6,5	полож.	1:32	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 3 пас.	5,92	полож.	1:16	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 4 пас.	4,75	полож.	1:8	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 6 пас.	6,5	полож.	1:32	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 12 пас.	4,5	полож.	1:8	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 13 пас.	4,5	полож.	1:16	полож.
Суспензия из узелков на семенниках	6,5	полож.	1:32	полож.
Суспензия из узелков на подгрудке	4,83	полож.	1:4	полож.
Суспензия из узелков на коже	3,5	полож.	1:16	полож.
Суспензия из узелков на коже	4,5	полож.	1:32	полож.
Суспензия из узелков на коже	3,5	полож.	1:2	сомнит.
Нормальный антиген (неинфицированная культура клеток)	отр.	отр.	< 1:2	отр.
Антиген ротавируса КРС	отр.	отр.	< 1:2	отр.
Антиген вирусной диареи КРС	отр.	отр.	< 1:2	отр.
Антиген вируса парагриппа-3 КРС	отр.	отр.	< 1:2	отр.

Полож. – положительный; отр. – отрицательный; сомнит. – сомнительный.

ционной активности 3,5–6,5 lg ТЦД₅₀/см³ были положительными в ПЦР-РВ. Установлен позитивно-негативный порог значения результатов реакции: < 1:2 – отрицательно, 1:2 – сомнительно и ≥ 1:4 – положительно.

При определении специфичности тест-системы с различными гетерологичными антигенами (ротавируса, вирусной диареи, вируса парагриппа-3, корона-вируса КРС, вируса ящура) получили отрицательный результат. Это свидетельствует о специфичности тест-системы.

Далее определяли аналитическую чувствительность твердофазного непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что в логарифмической размерности оценка среднего контраста исследуемых величин имела показатель 3,910. Коэффициент вариации выборки составил 9,6%. Ошибка измерения среднего контраста была ± 0,240.

Это означает, что на одну оценочную единицу lg T_{ИФА} в среднем приходилось 3,910 lg ТЦД₅₀ (т. е. 8128 ТЦД₅₀). С учетом стандартной ошибки измерения данный показатель находился в границах 4677 ± 14 125 (ТЦД₅₀). Установленные величины характеризуют относительную чувствительность разработанной тест-системы.

На рисунке 4 представлена диаграмма разброса значений lg T_{ИФА} (♦) соответственно величинам lg ТЦД₅₀. Приведена регрессионная модель вида lg T_{ИФА} = 0,219 (lg ТЦД₅₀) ± 0,041, где lg T_{ИФА} – прогнозируемая оценка титра в ИФА для заданного lg ТЦД₅₀.

Коэффициент корреляции между показателями lg T_{ИФА} и lg ТЦД₅₀ составил R = 0,634, что по шкале Чеддока [3] соответствует заметному уровню связи.

Диагностическая специфичность теста составила 100%, а аналитическая чувствительность – 3,5 lg ТЦД₅₀.

Разработанный «сэндвич»-вариант ИФА позволяет одновременно тестировать в формате 96-луночного планшета до 24 проб антигена в разведении 1:2–1:16.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в Российской Федерации разработана чувствительная и специфичная тест-система ИФА для выявления антигена вируса заразного узелково-

Рис. 4. Зависимость между инфекционным титром вируса (lg ТЦД₅₀) и титром вирусного антигена в ИФА (lg T_{ИФА})

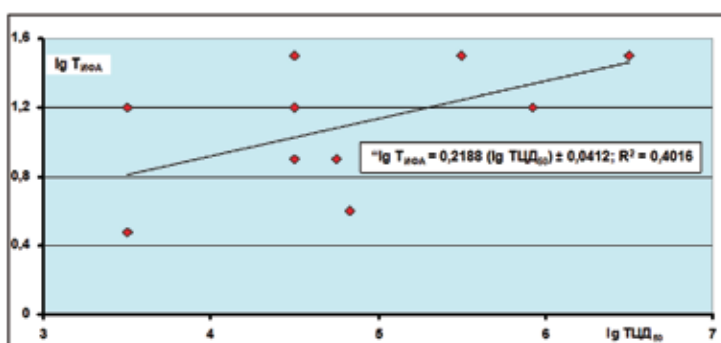


Таблица 2

Исследование связи между оценками Ig TЦД₅₀ и Ig T_{ИФА}

n = 3

Характеристика антигена	Титр, Ig TЦД ₅₀ /см ³	Непрямой «сэндвич»-вариант ИФА, Ig T _{ИФА}	Оценка контраста [d = (Ig TЦД ₅₀ /см ³) – (Ig T _{ИФА})]
Культуральный, 1 пас.	5,5 ± 0,1	1,505 ± 0,4	3,995 ± 0,12
Культуральный, 1 пас.	4,75 ± 0,2	0,903 ± 0,1	3,847 ± 0,36
Культуральный, 2 пас.	6,5 ± 0,5	1,505 ± 0,2	4,995 ± 0,24
Культуральный, 3 пас.	5,92 ± 0,4	1,204 ± 0,2	4,716 ± 0,21
Культуральный, 4 пас.	4,75 ± 0,5	0,903 ± 0,1	3,847 ± 0,26
Культуральный, 6 пас.	6,5 ± 0,2	1,505 ± 0,2	4,995 ± 0,36
Культуральный, 12 пас.	4,5 ± 0,1	0,903 ± 0,2	3,597 ± 0,23
Культуральный, 13 пас.	4,5 ± 0,3	1,204 ± 0,3	3,296 ± 0,21
Суспензия из узелков на семенниках	6,5 ± 0,2	1,505 ± 0,4	4,995 ± 0,36
Суспензия из узелков в области подгрудка	4,83 ± 0,1	0,602 ± 0,1	4,228 ± 0,45
Суспензия из узелков на коже в области шеи	3,5 ± 0,1	1,204 ± 0,4	2,296 ± 0,24
Суспензия из узелков на коже (Дагестан, с. Камилух)	3,5 ± 0,1	0,477 ± 0,3	3,023 ± 0,22
Суспензия из узелков на коже (Дагестан, с. Барнаб)	4,5 ± 0,2	1,505 ± 0,2	2,995 ± 0,20
Среднее значение контраста (± m)			3,910 ± 0,240

го дерматита КРС, позволяющая в течение 24 ч провести исследование биоматериала. Разработанная тест-система может быть использована сотрудниками научно-исследовательских учреждений и ветеринарных лабораторий для диагностики заразного узелкового дерматита КРС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видовая и штаммовая дифференциация каприпоксириусов методом полимеразной цепной реакции / Е. С. Орлова, А. В. Щербakov, В. И. Диев, В. М. Захаров // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 158–164.
2. Гуненков В. В. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота // Сборник науч. тр. ВГНКИ. – М., 2005. – Т. 66. – С. 46–54.
3. Методические рекомендации по анализу параметров в системах «доза-эффект» с альтернативным способом оценивания / В. Ю. Кулаков, С. Н. Колосов, А. В. Константинов [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2016. – 31 с.
4. Методические указания по выявлению ДНК полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) КРС с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: утв. Россельхознадзором 13.09.17 / МУ 35-17; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 11 с.
5. Мищенко В. А. Современная ситуация по инфекционным болезням КРС в России // Актуальные ветеринарные аспекты молочного и мясного животноводства: материалы международной конференции, 23–24 апреля 2015 г. – М., 2015. – С. 1–6.
6. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin diseases in cows / W. S. Awad, A. K. Ibrahim, K. Mahran [et al.] // Trop. Anim. Health Prod. – 2010. – Vol. 42, No. 4. – P. 777–783; doi: 10.1007/s11250-009-9486-5.
7. Kitching R. P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox // Vaccines for OIE list A and emerging animal diseases / ed. F. Brown, J. A. Roth // Dev. Biol. (Basel). – 2003. – Vol. 114. – P. 161–167.
8. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle / S. Babiuk, T. R. Bowden, G. Parkyn [et al.] // Transbound. Emerg. Dis. – 2008. – Vol. 55, No. 7. – P. 299–307; doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01024.x.

9. The novel Capripoxvirus vector lumpy skin disease virus (LSDV) efficiently boosts MVA HIV responses in rhesus macaques / W. A. Burgers, Z. Ginbot, Y.-J. Shen [et al.] // J. Gen. Virol. – 2014. – Vol. 95. – P. 2267–2272; doi: 10.1099/vir.0.067835-0.

REFERENCES

1. Species and strain differentiation of capripoxviruses using PCR. Ye. S. Orlova, A. B. Scherbakov, V. I. Diyeu, V. M. Zakharov. *Molecular Biology*. 2006; 40 (1): 158–164 (in Russian).
2. Gunenkov V. V. Lumpy skin disease. *Sbornik nauch. tr. VGNKI*. M., 2005; 66: 46–54 (in Russian).
3. Methodical recommendations for analysis of parameters in “dose-effect” systems using an alternative assessment method. V. Yu. Kulakov, S. N. Kolosov, A. V. Konstantinov [et al.]; FGBI “ARRIAH”. Vladimir, 2016 (in Russian).
4. Methodical instructions for isolating DNA of LSD field isolates using RT-PCR: approved by the Rosselkhoz nadzor 13.09.17. MU 35-17; FGBI “ARRIAH”. Vladimir, 2017 (in Russian).
5. Mischenko V. A. Contemporary situation of bovine infectious diseases in Russia. Topical veterinary issues of dairy and meat livestock production: materials of the international conference, April 23–24, 2015. M., 2015: 1–6 (in Russian).
6. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin diseases in cows / W. S. Awad, A. K. Ibrahim, K. Mahran [et al.]. *Trop. Anim. Health Prod.* 2010. Vol. 42 (4): P. 777–783; doi: 10.1007/s11250-009-9486-5.
7. Kitching R. P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox // *Vaccines for OIE list A and emerging animal diseases* / ed. F. Brown, J. A. Roth. *Dev. Biol. (Basel)*. 2003. Vol. 114: P. 161–167.
8. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle / S. Babiuk, T. R. Bowden, G. Parkyn [et al.]. *Transbound. Emerg. Dis.* 2008. Vol. 55 (7): P. 299–307; doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01024.x.
9. The novel Capripoxvirus vector lumpy skin disease virus (LSDV) efficiently boosts MVA HIV responses in rhesus macaques / W. A. Burgers, Z. Ginbot, Y.-J. Shen [et al.]. *J. Gen. Virol.* 2014. Vol. 95: P. 2267–2272; doi: 10.1099/vir.0.067835-0.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 20.07.18

АНАЛИЗ СМЕРТНОСТИ ОТ ПНЕВМОНИИ ОБЕЗЬЯН, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ, И МЕСТО МЕТИЦИЛЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) В СПЕКТРЕ ВЫДЕЛЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

В. А. Калашникова¹, А. В. Демерчян²

¹ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия, e-mail: vikky.aw@gmail.com

² Младший научный сотрудник, ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлен анализ смертности обезьян различных видов, содержащихся в условиях неволи, от пневмонии за 2017 г. Показана частота гибели животных и сезонность. Смертность детенышей и старых обезьян от пневмонии превышает таковую среди подростков и взрослых животных. Максимальный показатель смертности обезьян от пневмонии отмечен в феврале, апреле и мае. Установлен спектр микроорганизмов, выделенных из легких погибших животных. Преобладающей бактериальной флорой, обнаруживаемой при пневмониях, оказались *Staphylococcus aureus* (43,1%) и *Escherichia coli* (34,9%), выявленные как в монокультуре, так и в ассоциациях. Одной из особенностей пневмоний у обезьян является наличие высокой частоты полимикробных ассоциаций. Наиболее часто *S. aureus* встречается в сочетаниях с *E. coli* (52,5%). Все выделенные культуры *S. aureus* были метициллинчувствительными и не имели в своем геноме гена *mecA*. При бактериологическом исследовании аутопсийного материала возможна контаминация образцов легочной ткани посторонней флорой, поэтому утвердительно говорить о роли тех или иных микроорганизмов как основных возбудителей заболевания достаточно трудно.

Ключевые слова: обезьяны, пневмония, *Staphylococcus aureus*, энтеробактерии, микробные ассоциации.

UDC 619:616.24-002:599.82

ANALYSIS OF PNEUMONIA- ASSOCIATED MORTALITY OF MONKEYS IN CAPTIVITY AND THE ROLE OF METHICILLIN-SENSITIVE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) IN THE RECOVERED MICROFLORA SPECTRUM

V. A. Kalashnikova¹, A. V. Demerchyan²

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FSBSI "SRI MP", Sochi, Russia, e-mail: vikky.aw@gmail.com

² Junior Researcher, FSBSI "SRI MP", Sochi, Russia

SUMMARY

Pneumonia-associated mortality of different monkey species in captivity in 2017 has been analyzed. The animal death frequency and seasonality was demonstrated. Pneumonia-associated mortality in baby monkeys and old monkeys exceeds the mortality of infants and mature animals. The maximum pneumonia-mortality rate in monkeys was observed in February, April and May. The spectrum of microorganisms recovered from lungs of dead animals was identified. The prevailing bacterial flora detected in case of pneumonia was *Staphylococcus aureus* (43.1%) and *Escherichia coli* (34.9%), which were detected both in monoculture and communities. One of the peculiarities of pneumonia in monkeys is high occurrence of polymicrobial communities. Most frequently *S. aureus* is observed in combinations with *E. coli* (52.5%). All recovered *S. aureus* cultures were methicillin-sensitive and did not have gene *mecA* in their genome. During performance of bacteriological tests of autopsy material the lung tissue samples can get contaminated with the foreign flora that's why it's quite difficult to speak about the role of these and those microorganisms as major disease agents.

Key words: monkeys, pneumonia, *Staphylococcus aureus*, enterobacteria, microbial communities.

ВВЕДЕНИЕ

Пневмония – одно из самых распространенных в мире заболеваний, являющееся полиэтиологическим, преимущественно бактериальной, вирусной и вирусно-бактериальной природы. Способностью вызывать пневмонию обладает широкий спектр возбудителей как патогенных, так и условно-патогенных [1, 6]. Исследования последних десятилетий показывают, что у людей наиболее частыми возбудителями являются *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [3, 5, 6, 8–10, 12]. Согласно литературным данным, в настоящее время *S. aureus*, в том числе метициллинустойчивый золотистый стафилококк (MRSA), продолжает оставаться одним из наиболее распространенных патогенных микроорганизмов, вызывающих опасные инвазивные инфекции у людей и животных [11]. Однако в последние годы в этиологии пневмоний отмечается возрастание роли грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* [5, 9]. Наряду с этими микроорганизмами возбудителями пневмоний могут являться такие агенты, как легионеллы, микоплазмы, хламидии. В то же время некоторыми авторами указывается, что до 50% пневмоний остаются этиологически не расшифрованными [6].

В ветеринарной практике проблема пневмоний малоизучена, но весьма актуальна вследствие их частой регистрируемости у млекопитающих животных (кошки, собаки, лошади) [3, 12]. Актуальность исследования возбудителей пневмонии у обезьян, содержащихся в условиях неволи, обусловлена высокой степенью заболеваемости, приводящей к гибели животных.

Обезьяны различных видов, составляющие наряду с человеком единый эволюционный отряд приматов, широко используются для экспериментального изучения важнейших проблем медицины и биологии [7]. В последние десятилетия, в связи с резким сокращением популяций обезьян в местах естественного обитания и запретом отлова, основным источником лабораторных приматов стали питомники обезьян. В России это Адлерский питомник при ФГБНУ «НИИ ПМ», находящийся в г. Сочи. Обезьяны подвержены почти всем бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям, которыми болеют люди, некоторые животные и птицы [2, 4, 7], при этом пневмония занимает одно из ведущих мест в структуре причин гибели животных. Она регистрируется в качестве самостоятельного процесса, а также часто развивается как сопутствующее вторичное заболевание [4, 7]. В зарубежной литературе отсутствуют сведения о роли *S. aureus*, в том числе MRSA, и других бактериальных возбудителей в развитии спонтанных пневмоний у обезьян.

Цель работы – анализ гибели обезьян от пневмонии и частоты обнаружения *S. aureus* в микрофлоре легочной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За 2017 г. было проведено исследование 293 погибших обезьян, у 133 из которых поставлен патоморфологический диагноз «пневмония». Погибшие от пневмонии обезьяны были семи видов: макак-резус ($n = 44$), макак яванский ($n = 32$), макак лапундер ($n = 5$), макак магот ($n = 1$), мартышка зеленая ($n = 5$), павиан анубис ($n = 14$), павиан гамадрил ($n = 32$). Среди возрастных

групп павших животных с пневмонией преобладали детеныши в возрасте до года – 72,7%, подростки составили 21,2%, молодые животные (3–10 лет) – 23,2%, обезьяны 10–15 лет – 41,9% и старые животные (15–35 лет) – 50%.

Материалом для исследования служили кусочки легких размером 2 × 2 см, взятые из очага воспаления, которые помещались в стерильную емкость и доставлялись в лабораторию. Бактериологические посевы осуществляли на стандартные питательные среды (Эндо, Плоскирева), 5%-й кровяной агар (для выявления гемолитических свойств), желточно-солевой агар (для определения лецитиназной активности). Посевы инкубировали в термостате при 37 °C в течение 24 ч. Чистые бактериальные культуры идентифицировали до вида по биохимическим признакам с использованием тест-систем «ММТ С» и «ММТ Е24» (ООО НПО «Иммунотекс», Россия), которые основаны на определении у микроорганизмов ферментных систем, действующих на соответствующие субстраты. У культур стафилококков также оценивались фенотипические характеристики: морфология колоний, их пигментации, окраска по Граму, наличие способности к плазмокоагуляции и лецитиназной активности. Серологическая идентификация проводилась с помощью набора латекс-агглютинации на *S. aureus* (MRSA) Dryspot Staphytect Plus (Oxoid, Великобритания), позволяющего идентифицировать *S. aureus* и MRSA.

Полученные культуры *S. aureus* были исследованы методом ПЦР в режиме реального времени. Выделение тотальной ДНК стафилококков осуществляли из бактериальных суспензий ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл; эквивалентных значению 0,5 стандарта мутности МакФарланда), приготовленных из суточных агаровых культур *S. aureus* и суспендированных в 100 мкл NaCl с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя. Постановку реакции амплификации осуществляли с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия) на флуоресцентном детектирующем термодетекторе Rotor-Gene Q (Германия) согласно прилагаемой инструкции. Коммерческая тест-система позволяет идентифицировать *S. aureus* и детектировать генетические детерминанты резистентности бактерий, обуславливающие устойчивость к β-лактамам антибиотикам пенициллинового ряда у стафилококков (ген *mecA*).

Частоту встречаемости различных видов микроорганизмов рассматривали по показателю постоянства, вычисленному по формуле

$$C = \frac{p \times 100}{P},$$

где C – показатель постоянства;

p – число выборок, содержащих данный род (вид);

P – общее число взятых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

От пневмонии погибло 133 обезьяны, что составило 45,4% от общего числа погибших в 2017 г. особей, при этом у самцов пневмония зарегистрирована в 46,6% случаев, у самок – в 53,4%. Частота гибели от этого заболевания обезьян различных видов и возрастных групп представлена в таблице.

Таблица
Возрастные группы погибших обезьян различных видов

Виды обезьян	Возраст, годы (абсолютное кол-во/пневмония)					
	До 1	1–3	3–10	10–15	Старше 15	Всего
Макак-резус	34/21	8/2	31/5	26/7	19/10	118/44
Макак яванский	24/19	15/1	26/4	9/5	7/3	81/32
Макак лапундер	1/1	–	1/–	1/1	3/3	6/5
Макак магот	–	–	–	1/1	–	1/1
Мартышка зеленая	4/2	2/1	1/–	3/2	1/–	11/5
Павиан анубис	10/10	2/–	6/2	1/1	–	19/14
Павиан гамадрил	26/18	6/3	17/8	2/1	6/2	57/32
Всего	99/71	33/7	82/19	43/18	36/18	293/133

Как видно, наиболее высокий процент смертности был от пневмонии детенышей до 1 года (71,7%), а у подростков (до 3 лет) отмечен наиболее низкий процент – 21,2%. Наибольший процент пневмоний зарегистрирован у павианов анубисов (73,7%) и павианов гамадрилов (56,2%). Из шести погибших макак лапундеров у пяти поставлен диагноз «пневмония». У других видов частота гибели от пневмонии составила менее 50%.

Анализ смертности от пневмонии в течение года показал наличие сезонности (рис. 1).

Наиболее высока частота пневмоний в зимне-весенний период (49,7%). Летом гибель животных снижалась в 1,4 раза (35,1%). Пик гибели обезьян от пневмонии отмечен в феврале (61,9%), апреле (66,7%), мае (51,7%).

Чаще всего при пневмониях у обезьян воспалительный процесс охватывал сразу два легких (83,1%), в 16,9% случаев отмечалось одностороннее воспаление (правосторонняя пневмония – 59%, левосторонняя пневмония – 41%). Согласно данным, представленным на рисунке 2, у обезьян чаще регистрировалась двусторонняя очаговая пневмония (44,4%), двусторонняя полисегментарная пневмония морфологически определялась в 16,6% случаев. Пневмопатия новорожденных составила 2%.

Как известно, пневмонии имеют инфекционную природу, поэтому актуальность изучения спектра возбудителей имеет большое значение. При исследовании легких 133 обезьян, погибших от пневмонии, выделено 218 культур микроорганизмов, из них 49,1% – грам-

положительная флора (94 культуры – *S. aureus* (43,1%) и 13 культур – *Enterococcus* spp. (6%). Удельный вес грамотрицательной флоры составил 50,9%, при этом в 48,6% случаев были выделены энтеробактерии, в 2,3% – *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 3). Первое место по частоте встречаемости среди энтеробактерий занимает *E. coli* – 76 культур (34,9%), в 11% случаев обнаружены представители рода *Proteus* (24 культуры). В единичных случаях выделены *Klebsiella* spp. (1,4%), *Citrobacter diversus* (0,9%), *Yersinia pseudotuberculosis* (0,4%). В 5,3% случаев рост микроорганизмов на питательных средах отсутствовал.

Выделенная микрофлора представлена как в монокультуре, так и в ассоциациях. В монокультуре выделены 46 видов микроорганизмов, из них 25 изолятов *S. aureus* (54,4%), 14 изолятов *E. coli* (30,4%), три изолята *Enterococcus* spp. (6,5%) и по одному изоляту *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* (2,2%), *Klebsiella pneumoniae*. В 63,5% случаев выделена смешанная флора. Микробные комбинации включали сочетание *S. aureus* с энтеробактериями, а также представителей семейства *Enterobacteriaceae* между собой. Сочетания *S. aureus* представлены в двух-, трех- и четырехкомпонентных ассоциациях. Наиболее часто встречается сочетание *S. aureus* + *E. coli* (52,5%). Частота обнаружения микроорганизмов в составе двух- и трехкомпонентных комбинаций невысока: *S. aureus* + *Proteus* spp. (10%), *S. aureus* + *Enterococcus* spp. (7,5%), *S. aureus* + *Pseudomonas aeruginosa* (2,5%); *S. aureus* + *E. coli* + *Proteus* spp. (6,3%), *S. aureus* + *E. coli* + *Enterococcus* spp. (2,5%), *S. aureus* + *E. coli* + *Pseudomonas aeruginosa* (1,1%).

Отмечено по одному случаю таких комбинаций золотистого стафилококка, как *S. aureus* + *E. coli* + *Citrobacter diversus* + *Proteus* spp.; *S. aureus* + *E. coli* + *Citrobacter diversus* + *Enterococcus* spp.; *S. aureus* + *E. coli* + *Klebsiella ozaenae* + *Proteus* spp. (1,3%).

Изоляты *S. aureus* были взяты для молекулярно-генетического исследования с целью детекции гена *mecA*, являющегося генетической детерминантой резистентности бактерий, обуславливающей устойчивость к β-лактамам антибиотикам пенициллинового ряда у стафилококков. Установлено, что все культуры

Рис. 1. Сезонность гибели обезьян от пневмонии

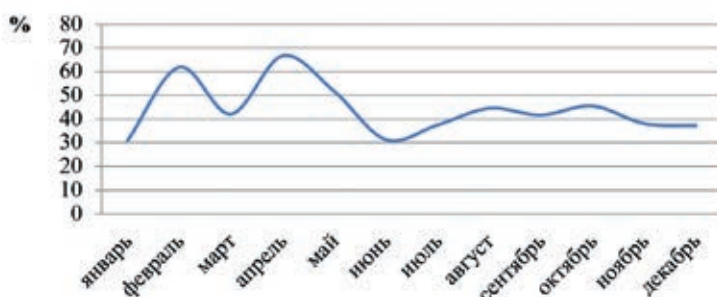




Рис. 2. Виды пневмоний по степени локализации патологического процесса и характеру воспаления легких у обезьян

S. aureus, выделенные из легких, не несли в своем геноме указанный ген, т. е. были метициллинчувствительные. Результаты ПЦР-диагностики полностью совпали с результатами теста латекс-агглютинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериологическое исследование является одним из основных методов в установлении этиологии пневмонии. При анализе данных проведенного исследования становится ясно, что многие микроорганизмы, присутствующие моно или в комбинации, могут привести к развитию инфекционного процесса в легких обезьян. Выделение бактерий из очагов воспаления регистрируется чаще, чем их отсутствие. Результаты исследования показали, что пневмония у обезьян в большинстве случаев имеет полимикробную этиологию. Частота обнаружения *S. aureus* и *E. coli* значительно выше, чем других бактерий. Преобладание при пневмониях обезьян метициллинчувствительного *S. aureus* (43,1%) позволяет говорить о ведущем месте этого микроорганизма в этиологической структуре пневмоний у обезьян, содержащихся в неволе. Также как возможные возбудители заболевания могут оцениваться *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из несвойственных им биотопов. Предположительно, это связано с низким иммунитетом, нарушением колонизационной резистентности бактерий, что влияет на характер течения инфекционного процесса. Как известно, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Staphylococcus*, выделенные в ассоциациях, чаще обладают различными факторами патогенности, чем изолированные в виде монокультур, что свидетельствует о реализации их патогенного потенциала в условиях симбиоза.

Анализируя частоту встречаемости отдельных микроорганизмов при пневмониях у обезьян, к постоянной микрофлоре отнесли *S. aureus* и *E. coli*, к добавочной – *Proteus* spp., к случайной – остальные бактерии. Выделение из легких таких бактерий, как *Enterococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.,

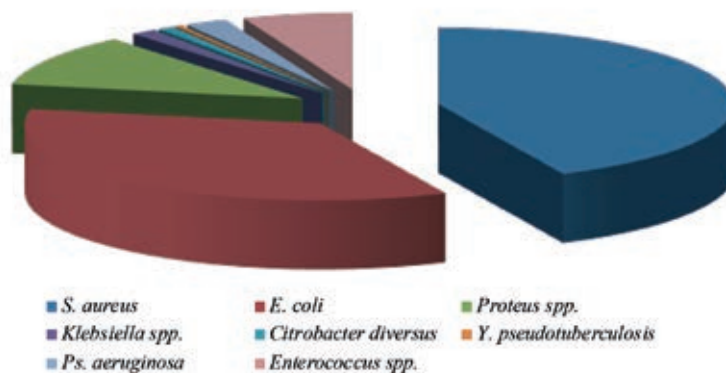


Рис. 3. Удельный вес микроорганизмов, выделенных из легких обезьян при пневмониях

Yersinia pseudotuberculosis, скорее свидетельствует о контаминации материала посторонней флорой, чем об этиологической значимости этих микроорганизмов.

Также обращают на себя внимание пневмонии нерасшифрованной этиологии. К сожалению, пока отсутствуют точные данные по детекции *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* и вирусных патогенов из легких обезьян, хотя, по сведениям литературных источников, эти микроорганизмы также могут являться одним из этиологических факторов пневмонии. Проведенные ранее (2008–2010 гг.) исследования по диагностике хламидий показали наличие в тканях легких обезьян *C. trachomatis* (до 30%), иногда в сочетании с *C. pneumoniae*. Также, согласно неопубликованным данным лаборатории инфекционной патологии ФГБНУ «НИИ МП», детекция *Mycoplasma* spp. составляла 5%.

В то же время при бактериологическом исследовании аутопсийного материала возможна вероятность контаминации легочной ткани, поэтому утвердительно говорить о роли тех или иных микроорганизмов как основных возбудителей заболевания достаточно трудно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бова А. А., Крыжановский В. Л. Этиология пневмоний // Медицинские новости. – 2000. – № 7. – С. 31–36.
2. Калашникова В. А. Детекция *Campylobacter jejuni* и *Helicobacter pylori*, ассоциированных с заболеваниями ЖКТ у обезьян // Ветеринарная патология. – 2009. – № 4 (31). – С. 8–12.
3. Костылева О. А. Стафилококкозы собак и кошек (клиника, лечение) // Вестник Алтайского ГАУ. – 2005. – № 2 (18). – С. 49–52.
4. Крылова Р. И. Сравнительная характеристика нозологического профиля людей и обезьян разных видов // Лабораторные приматы для решения актуальных проблем медицины и биологии: материалы симпозиума, 20–21 октября 2004 г., Москва. – М.: Издательство РАМН. – 2004. – С. 18–21.
5. Микробиологические аспекты диагностики внебольничной пневмонии / В. А. Невзорова, В. Б. Туркутюков, И. М. Мартыненко [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – Вып. 18. – С. 15–17.
6. Новиков Ю. К. Роль грамотрицательных бактерий в патологии нижних дыхательных путей // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2007. – № 1. – С. 55–60.
7. Проблемы инфекционной патологии обезьян / Б. А. Лапин, Э. К. Джикидзе, Р. И. Крылова [и др.]. – М.: Издательство РАМН, 2004. – 140 с.
8. Холодок Г. Н. Этиология острых пневмоний и характеристика возбудителей // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – Вып. 18. – С. 11–15.
9. Этиологическая структура внебольничной пневмонии / Н. Ф. Бруснигина, В. Н. Мазепа, Л. П. Самохина [и др.] // Медицинский альманах. – 2009. – № 2 (7). – С. 118–121.
10. Fatal *Streptococcus anginosus*-associated pneumonia in a captive Sumatran orangutan (*Pongo abelii*) / E. A. Ihms, J. B. Daniels, C. S. Koivisto [et al.] // J. Med. Primatol. – 2014. – Vol. 43, No. 1. – P. 48–51; doi: 10.1111/jmp.12085.
11. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in human and animals, Central Europe / W. Witte, B. Strommenger, C. Stanek, C. Cuny // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13, No. 2. – P. 255–258.
12. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses / K. E. Estell, A. Young, T. Kozikowski // J. Vet. Intern. Med. – 2016. – Vol. 30, No. 1. – P. 314–321; doi: 10.1111/jvim.13653.

REFERENCES

1. Bova A. A., Kryzhanovsky V. L. Pneumonia etiology. *Medicinskie novosti*. 2000; 7: 31–36 (in Russian).
2. Kalashnikova V. A. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*, associated with gastrointestinal diseases in monkeys. *Veterinary Pathology*. 2009; 4 (31): 8–12 (in Russian).
3. Kostyleva O. A. Staphylococcus infection in dogs and cats (clinical manifestations, treatment). *Vestnik Altajskogo GAU*. 2005; 2 (18): 49–52 (in Russian).
4. Krylova R. I. Comparative characteristics of human and primate nosological profile. Laboratory primates used to solve topical issues of medicine and biology: symposium materials, October 20–21, 2004, Moscow. M.: RAMS Publishing House; 2004: 18–21 (in Russian).
5. Microbiological aspects of community-acquired pneumonia. V. A. Nevzorova, V. B. Turkutukov, I. M. Martynenko [et al.]. *Bjulleten' fiziologii i patologii dyhanija*. 2004; 18: 15–17 (in Russian).
6. Novikov Yu. K. Role of gram-negative bacteria in pathology of low respiratory pathways. *Atmosfera. Pul'monologija i allergologija*. 2007; 1: 55–60 (in Russian).
7. Problems of primate infectious pathology. B. A. Lapin, E. K. Kikidze, R. I. Krylova [et al.]. M.: RAMS Public House, 2004 (in Russian).
8. Holodok G. N. Etiology of acute pneumonia and agent characteristics. *Bjulleten' fiziologii i patologii dyhanija*. 2004; 18: 11–15 (in Russian).
9. Etiological structure of community-acquired pneumonia. N. F. Brusnigina, V. N. Mazepa, L. P. Samokhina [et al.]. *Medicinskij al'manah*. 2009; 2 (7): 118–121 (in Russian).
10. Fatal *Streptococcus anginosus*-associated pneumonia in a captive Sumatran orangutan (*Pongo abelii*). E. A. Ihms, J. B. Daniels, C. S. Koivisto [et al.]. *J. Med. Primatol*. 2014; 43 (1): 48–51; doi: 10.1111/jmp.12085.
11. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in human and animals, Central Europe. W. Witte, B. Strommenger, C. Stanek, C. Cuny. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13 (2): 255–258.
12. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses. K. E. Estell, A. Young, T. Kozikowski. *J. Vet. Intern. Med*. 2016; 30 (1): 314–321; doi: 10.1111/jvim.13653.

Поступила 16.07.18
Принята в печать 16.08.18

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Г. С. Скитович¹, Н. Б. Шадрова², О. В. Прунтова³, К. В. Серова⁴

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

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

³ Главный эксперт, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁴ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: serova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Listeria monocytogenes – один из основных контаминантов пищевых продуктов, вызывающий заболевание, называемое листериоз. По количеству выявленных случаев он значительно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам, но превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов. Поэтому разработка видоспецифичных методов ПЦР для выявления генома *L. monocytogenes* является актуальной задачей. Оптимизирована методика выявления генома бактерий *L. monocytogenes* посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Мишенью амплификации являлся высокоспецифичный и подходящий для точной качественной оценки всех штаммов ген *iap*, кодирующий поверхностный белок р60 *L. monocytogenes*. Подобрана оптимальная концентрация магния (6 мМ) и температура отжига праймеров (57 °С). Определены чувствительность и специфичность данной методики. Предел обнаружения составил 120 молекул-мишеней. Полученные результаты показывают, что оптимизированный вариант ПЦР-РВ, основанный на амплификации гена *iap*, позволяет выявлять *L. monocytogenes* в пробах продовольственного сырья животного происхождения и пищевых продуктов. Скрининговые исследования на основе оптимизированной ПЦР-РВ обеспечивают быстрые и надежные результаты.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, *Listeria monocytogenes*, пищевые продукты животного происхождения.

UDC 619:579.869.1:616-076

REAL-TIME PCR OPTIMIZATION FOR *LISTERIA MONOCYTOGENES* GENOME DETECTION

G. S. Skitovich¹, N. B. Shadrova², O. V. Pruntova³, K. V. Serova⁴

¹ Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: skitovich@arriah.ru

² Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: shadrova@arriah.ru

³ Chief Expert, Doctor of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁴ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: serova@arriah.ru

SUMMARY

Listeria monocytogenes is one of the major food contaminants causing the illness, called Listeriosis. Listeriosis incidence is much less, than the number salmonellosis and campylobacteriosis cases, but the clinical disease is significantly more severe and has a higher mortality. That's why the development of species-specific PCR techniques to detect *L. monocytogenes* genome is a topical task. *L. monocytogenes* bacteria genome detection technique using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was improved. The amplification target was a highly specific and suitable for qualification of all strains *iap* gen, coding *L. monocytogenes* p60 surface protein. Optimum magnesium concentration (6 mM) and primer annealing temperature (57 °C) were selected. The sensitivity and specificity of the technique were identified. Detection threshold was 120 target molecules. The results obtained demonstrate that optimized qRT-PCR version, based on *iap* gen amplification, enables to detect *L. monocytogenes* in animal product and food samples. Optimized qRT-PCR-based screening tests ensure rapid and reliable results.

Key words: qRT-PCR, *Listeria monocytogenes*, food products of animal origin.

ВВЕДЕНИЕ

Listeria monocytogenes – факультативный внутриклеточный патоген, один из основных контаминантов пищевых продуктов, вызывающий редкое, но летальное заболевание, поражающее людей с ослабленным иммунитетом, называемое листериозом. Листериоз не является широко распространенной инфекцией. По количеству выявленных случаев он значительно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам, но превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов [1]. *L. monocytogenes* обычно сосуществуют с другими видами этого рода, такими как непатогенная *Listeria innocua*, которая может быть использована в качестве индикатора возможного присутствия *L. monocytogenes* в пищевых продуктах [15]. Требования безопасности пищевых продуктов, принятые в большинстве стран, не допускают наличия *L. monocytogenes* [6, 18].

Идентификация *L. monocytogenes* в соответствии с действующими нормативными документами осуществляется традиционными микробиологическими (микроскопия, посев на питательные среды) и серологическими методами (реакция агглютинации, реакция связывания комплемента) [4, 8].

Однако время исследований традиционными методами варьирует от 3–4 дней при отрицательном результате, а для подтверждения положительного результата требуется до 7 дней [24]. Обнаружение *L. monocytogenes* в продуктах животного происхождения микробиологическим методом затруднено из-за высокой концентрации конкурентоспособной микрофлоры, низкого уровня *L. monocytogenes* и наличия ингибирующих листерию пищевых компонентов [23]. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) представляет собой быструю и практичную альтернативу микробиологическому методу. Поэтому разработка видоспецифичных методов ПЦР для выявления генома *L. monocytogenes* является актуальной задачей.

Молекулярные методы, такие как ПЦР, позволяют быстро обнаружить и идентифицировать бактериальные патогены [27]. В литературе приведены результаты по применению нескольких традиционных ПЦР, позволяющих выявлять *L. monocytogenes* [13, 15, 19, 21]. А также описаны варианты ПЦР-РВ для ее обнаружения [2, 12, 16, 26, 28].

При идентификации *L. monocytogenes* в настоящее время в качестве мишеней для ПЦР используют различные гены: 16S и 23S рРНК, *prs*, *gyrB*, *rpoB*, *hly*, *inlA* и *inlB*, *plcA*, *iap* и др. [3, 7, 10, 11, 14, 15, 17, 20, 22, 30].

Целью данного исследования была оптимизация качественной ПЦР-РВ для обнаружения генома *L. monocytogenes* при исследовании пищевых продуктов животного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий. В работе использовали референтные штаммы, полученные из американской коллекции типовых культур (ATCC): *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella sonnei* ATCC 11060, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Yersinia kristensenii* ATCC 35669.

Питательные среды и условия культивирования бактерий. Все референтные штаммы культивировали на колумбийском агаре (производство фирмы HiMedia, Индия) при температуре 37 °C в течение 24 ч.

В качестве среды для первичного обогащения листерий использовали «Питательный бульон для листерий» (ПБЛ) (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск).

Среда для вторичного обогащения – удвоенный ПБЛ (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск).

Образцы пищевых продуктов. При разработке методики использовали 100 образцов пищевых продуктов, поступивших на исследование в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г. Образцы представляли следующие группы продуктов животного происхождения:

- мясо (говядина – 8 проб, свинина – 10 проб, птица – 10 проб);
- полуфабрикаты (мясные – 18 проб, куриные – 7 проб);
- рыба и рыбные продукты – 12 проб;
- молоко пастеризованное – 6 проб;
- масло сливочное – 29 проб.

Подготовка образцов к исследованию. Навеску образца массой 25 г, или объемом 25 см³, подготовленную для исследования, вносили в 225 см³ среды для первичного обогащения листерий. Посевы инкубировали при температуре (30 ± 1) °C в течение (24 ± 3) ч. После этапа первичного обогащения 0,1 см³ образца, независимо от наличия изменений среды, добавляли в пробирку, содержащую 10 см³ среды для вторичного обогащения. Инкубировали при температуре (37 ± 1) °C в течение (48 ± 2) ч. После инкубации отбирали 250 мкл суспензии в полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и использовали для тестирования в ПЦР-РВ.

Выделение и количественное определение ДНК. ДНК выделяли из образцов чистых культур с помощью набора «СОРБ-ГМО-А» («Синтол», Москва) в соответствии с рекомендациями производителя.

Олигонуклеотиды. Праймеры и зонды для идентификации бактерий *L. monocytogenes*, используемые в данной работе и описанные ранее в работе D. Rodríguez-Lázaro и соавт. [25] (GenBank AY174670 – AY174682), были синтезированы фирмой «Синтол». Первичная структура олигонуклеотидов представлена в таблице 1.

Условия проведения ПЦР-РВ. Для постановки ПЦР использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ» («Синтол», Россия). Реакционную смесь собирали из следующих компонентов в расчете на одну пробу объемом 20 мкл: 10х ПЦР-буфер – 2,5 мкл; dNTP 2,5 мМ – 2,5 мкл; MgCl₂ 25 мМ – 2,5 мкл; смесь праймеров и зонда (10 пкмоль/мкл каждого) – 0,75 мкл; SypTaq ДНК-полимераза 5 Е/мкл – 0,5 мкл; ddH₂O – 11,25 мкл.

Для амплификации использовали термостат CFX-96 (Bio-Rad, США), при условиях: 20 с при 95 °C и 45 циклов 20 с при 95 °C, 20 с при 57 °C и 20 с при 72 °C.

Таблица 1
Структура праймеров и зонда [по D. Rodríguez-Lázaro, 2004]

Наименование	Последовательность
<i>iap</i> QF	[5'-AATCTGTAGCGCAACTTGGTTAA-3']
<i>iap</i> QR	[5'-CACCTTGTATGACGTAATAATACTGTT-3']
<i>iap</i> QProbe (FAM-RTQ1)	[5'-CAACACCAGCGCCACTACGGACG-3']

Определение чувствительности ПЦР-РВ. Для оценки чувствительности праймеров использовали ДНК, выделенную из суспензии референтного штамма *L. monocytogenes* ATCC 19115 с оптической плотностью 1 ед. по стандарту МакФарланда, что соответствует 3×10^8 КОЕ/см³. Концентрацию эталонного штамма подтверждали методом титрования на плотной питательной среде. Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием спектрофотометра Implen NanoPhotometer P-Class P-360 (Implen, Германия). Разведения ДНК готовили с использованием буфера TE в объеме 100 мкл.

Статистическая обработка данных. Результаты ПЦР-РВ анализировали с помощью программного обеспечения системы v3.1 (CFX Manager Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор праймеров. По результатам анализа литературных данных для проведения ПЦР-РВ был выбран ген *iap* (GenBank, № X52268), который кодирует поверхностный белок р60, известный также как гидролаза клеточной стенки [29]. Основанием для выбора явилось то, что этот белок у *L. monocytogenes* имеет две уникальные области последовательностей, отсутствующие у других видов листерий, что делает его высокоспецифичным и подходящим для точной качественной оценки всех штаммов *L. monocytogenes* [1].

Сравнивая *iap*-родственные гены разных видов листерий, А. Burbert и соавт. [15] определили общие и переменные области в пределах этих генов, специфичных для каждого из видов *Listeria*. Основываясь на этих последовательностях гена *iap*, были разработаны праймеры ПЦР для *L. monocytogenes* (табл. 1) [25].

Оптимизация ПЦР-РВ для специфического обнаружения бактерий *L. monocytogenes*. Оптимизация ПЦР-РВ включает следующие этапы: определение точной температуры отжига праймеров и концентрацию ионов магния, при которых отмечается наивысшая интенсивность ответного флуоресцентного сигнала, при высокой специфичности. Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и обычно варьирует от 55 до 72 °С [9].

Для расчета температуры отжига праймеров использовали формулу

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C),$$

где T_m – температура отжига, °С;

A, T, C, G – нуклеотидные основания [9].

В результате проведенных расчетов были получены температуры отжига 66 °С для прямого и 76 °С для обратного праймеров. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, при написании программы ПЦР выбирается наименьшая. Для определения оптимальной температуры проводили ПЦР-РВ в градиенте $\pm 10^\circ$ С от вычисленной температуры отжига праймеров и концентрации ионов магния от 3 до 6 мМ с шагом 0,5 мМ. В ПЦР получили идентичные результаты с уровнем магния от 4 до 6 мМ и была выбрана концентрация магния 6 мМ. Для всех температур от 56 до 75 °С были получены практически идентичные результаты. При 76 °С наблюдали снижение эффективности реакции. На основании проведенного эксперимента оптимальной была выбрана температура отжига 57 °С.

Оптимизировали концентрации праймеров и зонда для специфичного анализа с использованием тех

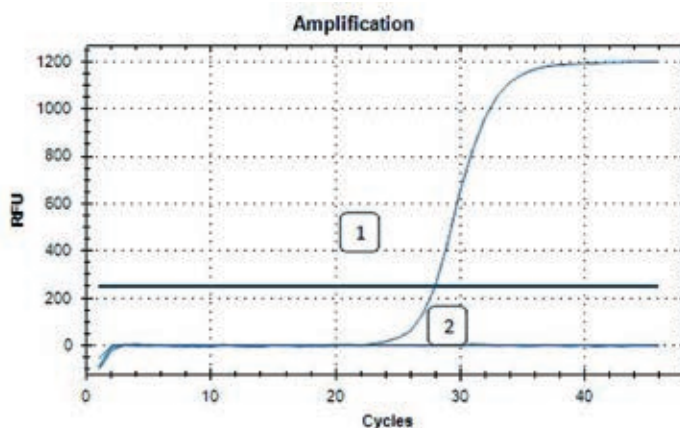


Рис. 1. Амплификация ДНК *L. monocytogenes*

1 – положительный результат; 2 – отрицательный результат.

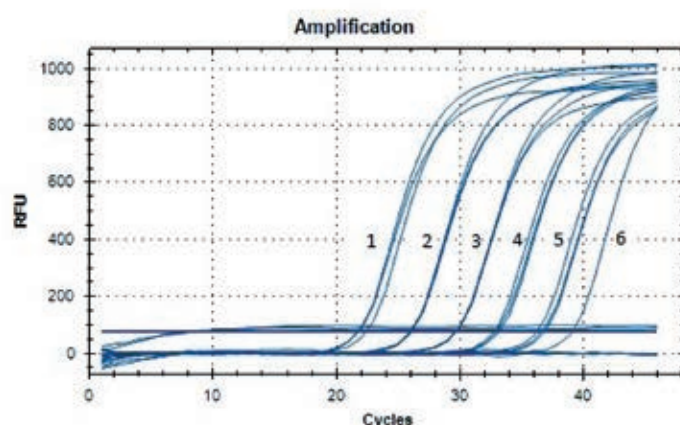


Рис. 2. Определение аналитической чувствительности ПЦР-РВ при идентификации генома *L. monocytogenes* (n = 3)

Концентрация бактериальных клеток: 1 – 12×10^5 ; 2 – 12×10^4 ; 3 – 12×10^3 ; 4 – 12×10^2 ; 5 – 120; 6 – 12.

же циклов, что и для разработанного ранее анализа ПЦР-РВ [5]. Оптимальные условия, которые показывают наименьшее значение для порогового цикла (C_t) с наименьшими концентрациями праймеров и зонда (рис. 1), указаны в материалах и методах.

Определение чувствительности оптимизированной ПЦР-РВ. Важной характеристикой разработанного ПЦР-протокола является его чувствительность. Для оценки чувствительности реакции использовали выделенную ДНК, концентрация которой составила 4 нг/мкл.

В соответствии со средним размером генома различных исследуемых микроорганизмов 1 нг геномной ДНК соответствует как минимум 3×10^5 клеткам [28]. Таким образом, концентрация ДНК 4 нг/мкл соответствует приблизительно 12×10^5 бактериальным клеткам.

Чувствительность ПЦР-РВ определяли путем постановки реакций 10-кратных разведений выделенной ДНК, начиная с максимальной, равной 4 нг/мкл, и до 4×10^{-6} нг/мкл, что соответствует 1,2 бактериальной клетки в реакции. Реакцию амплификации проводили в трех повторностях (рис. 2).

Полученные результаты показали, что оптимизированный вариант ПЦР-РВ позволяет выявлять геном *L. monocytogenes* при содержании 120 бактериальных

Таблица 2
Предел обнаружения штамма *L. monocytogenes* ATCC 19115 в ПЦР-РВ
 ($n = 3$)

Образец	Среднее значение C_q	Стандартное отклонение C_q	Конечные ОЕФ	Результат
Neg Ctrl	0,00	0,000	-1,45	(-) Negative
12×10^5	21,61	0,260	970	(+) Positive
12×10^4	26,03	0,072	1072	(+) Positive
12×10^3	29,67	0,040	1045	(+) Positive
12×10^2	33,00	0,170	1004	(+) Positive
120	36,59	0,346	940	(+) Positive
12	39,04	0,000	0,196	(-) Negative
1,2	0,00	0,000	-1,55	(-) Negative

клеток в образце, что согласуется с данными других исследователей [12, 25]. Содержание в образце ДНК *L. monocytogenes*, соответствующее приблизительно 12 бактериальным клеткам, выявили только в одной ПЦР-РВ из трех проведенных (табл. 2).

Определение специфичности. Специфичность праймеров тестировали с использованием целевого (*L. monocytogenes*) и 13 нецелевых штаммов бактерий (табл. 3). В реакции был идентифицирован только целевой штамм *L. monocytogenes*. Не было зафиксировано ни одного ложноположительного результата, что подтверждает видоспецифичность предложенного варианта ПЦР-РВ.

Выявление генома бактерий *L. monocytogenes* в продуктах животного происхождения. С использовани-

ем оптимизированной ПЦР-РВ исследовали 100 проб продуктов животного происхождения (табл. 4), которые также были протестированы и традиционным микробиологическим методом. Геном *L. monocytogenes* был выявлен в 16% образцов. При исследовании тех же проб микробиологическим методом положительными оказались только 8% проб. Различие в результатах исследований можно объяснить способностью ПЦР выявлять генетический материал не только живых микроорганизмов, но и погибших, в отличие от микробиологического метода, с помощью которого можно обнаружить только живые микроорганизмы.

Результаты показали, что скрининговые исследования на основе оптимизированной ПЦР-РВ обеспечивают быстрые и надежные результаты.

Таблица 3
Определение специфичности праймеров для выявления генома *L. monocytogenes*

№ п/п	Вид бактерий	Штамм	Оценка по Граму	Праймеры <i>iap</i>
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	+	+
2	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	+	-
3	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	+	-
4	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	+	-
5	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	+	-
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	+	-
7	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-
8	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	+	-
9	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	-	-
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-
11	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	-	-
12	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 P	+	-
14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	-	-

Таблица 4

Определение *L. monocytogenes* в образцах пищевых продуктов микробиологическим методом и ПЦР-РВ

№ п/п	Наименование образца	Количество проб	Количество положительных проб	
			ПЦР-РВ	микробиологический метод
1	Говядина	8	4 (50%)	1 (12%)
2	Свинина	10	2 (20%)	1 (10%)
3	Полуфабрикаты мясные	18	4 (22%)	3 (17%)
4	Птица	10	3 (30%)	2 (20%)
5	Полуфабрикаты куриные	7	3 (43%)	1 (14%)
6	Рыба и рыбные продукты	12	0	0
7	Молоко пастеризованное	6	0	0
8	Масло сливочное	29	0	0
Всего		100	16 (16%)	8 (8%)

Основным преимуществом использования оптимизированной ПЦР-РВ для скрининговых исследований является возможность быстрого выявления образцов, являющихся отрицательными по контролируемому патогенному организму, т. е. по наличию в нем генома *L. monocytogenes*. Однако этот метод не позволяет отличать жизнеспособные бактериальные клетки от нежизнеспособных. Поэтому положительные результаты, полученные в ПЦР-РВ, обязательно должны быть подтверждены микробиологическим методом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизирована ПЦР-РВ для выявления генома *L. monocytogenes*. Определены аналитическая чувствительность и специфичность ПЦР-РВ, установлен предел обнаружения генома *L. monocytogenes* 120 молекул-мишеней в исследуемом образце.

Показана возможность применения оптимизированной ПЦР-РВ для выявления генома *L. monocytogenes* в образцах продуктов животного происхождения при скрининговых исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бхуния А. К. Патогенные микроорганизмы пищевых продуктов. – СПб.: Профессия, 2014. – 342 с.
- Васильев Д. А., Ковалева Е. Н., Мастиленко А. В. Идентификация бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* методом мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» // Биотика. – 2014. – № 1 (1). – С. 3–6.
- Зайцева Е. А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2010. – 270 с.
- Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей: утв. начальником ГУВ Госагропрома СССР А. Д. Третьяковым от 13 февраля 1987 г. – URL: http://www.libussr.ru/doc_usrr/usrr_13807.htm (дата обращения: 05.02.18).
- Методические указания по выявлению генома *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах с помощью ПЦР-РВ / А. В. Пискунов, О. В. Прунтова; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2013. – 17 с.
- Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яйцопродуктов: пер. с англ. / под ред. Дж. К. Мида. – СПб.: Профессия, 2008. – 384 с.
- Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* / Т. И. Карпова, С. А. Ермолаева, И. В. Лопырев [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 266–273.
- Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*: ГОСТ 32031-2012. – М.: Стандартинформ, 2014. – 47 с.

9. Рекомендации по постановке ПЦР / Евrogen. – Вер. 18 сентября 2017 г. – URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf> (дата обращения: 05.02.18).

10. Тартаковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – М.: Медицина для всех, 2002. – 200 с.

11. A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR–SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus / A. Lehner, S. Loncarevic, M. Wagner [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 1999. – Vol. 34, No. 3. – P. 165–171.

12. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk / H. K. Nogva, K. Rudi, K. Naterstad [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, No. 10. – P. 4266–4271; doi: 10.1128/AEM.66.10.4266-4271.2000.

13. Application of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous confirmation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria species* in turkey sample surveillance / I. V. Wesley, K. M. Harmon, J. S. Dickson, A. R. Schwartz // J. Food Prot. – 2002. – Vol. 65, No. 5. – P. 780–785.

14. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria species* / B. Sallen, A. Rajoharison, S. Desvarenne [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996. – Vol. 46, No. 3. – P. 669–674; doi: 10.1099/00207113-46-3-669.

15. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR / A. Bubert, I. Hein, M. Rauch [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, No. 10. – P. 4688–4692.

16. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay / I. Hein, D. Klein, A. Lehner [et al.] // Res. Microbiol. – 2001. – Vol. 152, No. 1. – P. 37–46; [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01166-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01166-9).

17. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR / M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, No. 8. – P. 3819–3822; doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.

18. Gallagher D. L., Ebel E. D., Kause J. R. Draft FSIS Risk Assessment for *Listeria* in Ready-to-eat Meat and Poultry Products. – Washington, 2003. – URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.198.7563&rep=rep1&type=pdf> (дата обращения: 05.02.18).

19. Lawrence L. M., Gilmour A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60, No. 12. – P. 4600–4604.

20. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages / R. Meinersmann, R. W. Phillips, M. Wiedmann, M. E. Berrang // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, No. 4. – P. 2193–2203; doi: 10.1128/AEM.70.4.2193-2203.2004.

21. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food / N. S. Bansal, F. H. McDonnell, A. Smith [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 1996. – Vol. 33, No. 2–3. – P. 293–300; [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01161-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01161-0).

22. Nightingale K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, No. 16. – P. 5537–5551; doi: 10.1128/JB.187.16.5537-5551.2005.

23. Norton D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: Toward real-time screening for food and environmental samples // *J. AOAC Int.* – 2002. – Vol. 85, No. 2. – P. 505–515.
24. Paoli G. C., Bhunia A. K., Bayles D. O. *Listeria monocytogenes* // *Food-borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology* / ed. P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith. – Norfolk: Caister Academic, 2005. – P. 295–325.
25. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology / D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, M. Scotti [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, No. 3. – P. 1366–1377; doi: 10.1128/AEM.70.3.1366-1377.2004.
26. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction / A. J. Hough, S. A. Harbison, M. G. Savill [et al.] // *J. Food Prot.* – 2002. – Vol. 65, No. 8. – P. 1329–1332.
27. Rijpens N. P., Herman L. M. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens // *J. AOAC Int.* – 2002. – Vol. 85, No. 4. – P. 984–995.
28. Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 233, No. 2. – P. 257–267; https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09490.x.
29. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes* / S. Köhler, M. Leimeister-Wächter, T. Chakraborty [et al.] // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58, No. 6. – P. 1943–1950.
30. σ^B -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment / D. Sue, D. Fink, M. Wiedmann, K. J. Boor // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150 (Pt. 11). – P. 3843–3855; doi: 10.1099/mic.0.27257-0.

REFERENCES

1. Bkhuia A. K. Pathogenic Microorganisms of Food Products. SPb.: Professia, 2014 (in Russian).
2. Vasiliev D. A., Kovaleva Ye. N., Mastilenko A. V. Identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* bacteria species by multiplex real-time PCR. Biotika. 2014; 1 (1): 3–6 (in Russian).
3. Zaitseva Ye. A. Microbiological and molecular and genetic marker analysis system for detection of highly virulent *Listeria monocytogenes* strains: Doctorate thesis (Medical Science). M., 2010 (in Russian).
4. Guidelines on laboratory diagnostics of human and animal listeriosis: Approved by Head of Main Veterinary Department of the USSR Gosagroprom A. D. Tretyakov on February 13, 1987. URL: http://www.libussr.ru/doc_ussr/usr_13807.htm (request date: 05.02.18) (in Russian).
5. Guidelines on *Listeria monocytogenes* genome detection in foodstuffs by qRT-PCR. A. V. Piskunov, O. V. Pruntova; FGBI "ARRIAH". Vladimir, 2013 (in Russian).
6. Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs: Translation from English. Ed. G. C. Mead. SPb.: Professia, 2008 (in Russian).
7. New techniques of *Listeria monocytogenes* identification. T. I. Karpova, S. A. Yermolayeva, I. V. Lopyrev [et al.]. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 3 (3): 266–273 (in Russian).
8. Food Products. *Listeria monocytogenes* Bacteria Detection Techniques: GOST 32031-2012. M.: Standartinform, 2014 (in Russian).
9. PCR Design Recommendations. Evrogen. – September 18, 2017. – URL: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf> (request date: 05.02.18) (in Russian).
10. Tartakovsky I. S., Maleyev V. V., Yermolayeva S. A. Listeria: Role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. M.: Meditsina dlya vseh, 2002 (in Russian).
11. A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus. A. Lehner, S. Loncarevic, M. Wagner [et al.]. *J. Microbiol. Methods*. 1999; 34 (3): 165–171.
12. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. H. K. Nogva, K. Rudi, K. Naterstad [et al.]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66 (10): 4266–4271; doi: 10.1128/AEM.66.10.4266-4271.2000.
13. Application of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous confirmation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in turkey sample surveillance. I. V. Wesley, K. M. Harmon, J. S. Dickson, A. R. Schwartz. *J. Food Prot.* 2002; 65 (5): 780–785.
14. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. B. Sallen, A. Rajoharison, S. Desvarenne [et al.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; 46 (3): 669–674; doi: 10.1099/00207713-46-3-669.
15. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. A. Bubert, I. Hein, M. Rauch [et al.]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65 (10): 4688–4692.
16. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. I. Hein, D. Klein, A. Lehner [et al.]. *Res. Microbiol.* 2001; 152 (1): 37–46; https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01166-9.
17. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser [et al.]. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (8): 3819–3822; doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.
18. Gallagher D. L., Ebel E. D., Kause J. R. Draft FSIS Risk Assessment for *Listeria* in Ready-to-eat Meat and Poultry Products. Washington, 2003. URL: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.198.7563&rep=rep1&type=pdf> (дата обращения: 05.02.18).
19. Lawrence L. M., Gilmour A. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60 (12): 4600–4604.
20. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. R. Meinersmann, R. W. Phillips, M. Wiedmann, M. E. Berrang. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (4): 2193–2203; doi: 10.1128/AEM.70.4.2193-2203.2004.
21. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. N. S. Bansal, F. H. McDonnell, A. Smith [et al.]. *Int. J. Food Microbiol.* 1996; 33 (2–3): 293–300; https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01161-0.
22. Nightingale K., Windham K., Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (16): 5537–5551; doi: 10.1128/JB.187.16.5537-5551.2005.
23. Norton D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: Toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.* 2002; 85 (2): 505–515.
24. Paoli G. C., Bhunia A. K., Bayles D. O. *Listeria monocytogenes* // *Food-borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Ed. P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith. Norfolk: Caister Academic, 2005: 295–325.
25. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, M. Scotti [et al.]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (3): 1366–1377; doi: 10.1128/AEM.70.3.1366-1377.2004.
26. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. A. J. Hough, S. A. Harbison, M. G. Savill [et al.]. *J. Food Prot.* 2002; 65 (8): 1329–1332.
27. Rijpens N. P., Herman L. M. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J. AOAC Int.* 2002; 85 (4): 984–995.
28. Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 233 (2): 257–267; https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09490.x.
29. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. S. Köhler, M. Leimeister-Wächter, T. Chakraborty [et al.]. *Infect. Immun.* 1990; 58 (6): 1943–1950.
30. σ^B -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. D. Sue, D. Fink, M. Wiedmann, K. J. Boor. *Microbiology.* 2004; 150 (Pt. 11): 3843–3855; doi: 10.1099/mic.0.27257-0.

Поступила 09.02.18

Принята в печать 06.08.18

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КОШЕК НА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Е. Г. Кокорина¹, Э. И. Элизбарашвили²

¹ Ведущий научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: babushka.karlsona@mail.ru

² Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты сравнительной оценки культуральных свойств вируса инфекционного ринотрахеита кошек на первичных и перевиваемых культурах клеток «кошачьего» происхождения (ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg). Установлено, что репродукция вируса инфекционного ринотрахеита, независимо от способа заражения и метода культивирования, носила закономерный характер и была практически равной в чувствительных культурах клеток. Максимальное проявление цитопатического эффекта (свыше 75% дегенерации монослоя) во всех видах культур клеток было отмечено через 48–72 ч культивирования. Однако наибольшее накопление вируса инфекционного ринотрахеита кошек штамма «Гранд» зависит от времени предварительной адсорбции при заражении в дозе 5,5 lg TCID₅₀/мл монослойных культур клеток при культивировании роликовым методом и поддержании pH среды на уровне 7,0–7,4. Установлено, что однократное замораживание культурального вируса при температуре –60 °C по окончании цикла культивирования (в течение 60–72 ч) и его размораживание достоверно повышало титр на 0,5 lg TCID₅₀/мл.

Ключевые слова: инфекционный ринотрахеит кошек, репродукция вируса, первичная культура клеток, перевиваемая культура клеток.

UDC 619:578.835.21:57.082.26

COMPARATIVE STUDIES OF FELINE VIRAL RHINOTRACHEITIS VIRUS FOR ITS REPLICATION PROPERTIES IN DIFFERENT CELL CULTURES

Ye. G. Kokorina¹, E. I. Elizbarashvili²

¹ Leading Researcher, FGBI "VGNKI", Moscow, Russia, e-mail: babushka.karlsona@mail.ru

² Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "VGNKI", Moscow, Russia

SUMMARY

The results of comparative studies of feline viral rhinotracheitis virus for its culture properties in primary and continuous cell cultures of feline origin (FK, FK (subculture), CrFK, FS, CC-81, FC/Tg) are presented. It was found that viral rhinotracheitis virus replication, irrespective of the route of infection and the culture technique, was consistent and practically equal in susceptible cell cultures. The most pronounced cytopathic effect (more than 75% monolayer degeneration) was observed in all types of cell cultures in 48–72 hours of cultivation. However, the accumulation of feline viral rhinotracheitis virus Grand strain was highest when preliminary adsorption occurred within the specified period of time, monolayer cell cultures were infected with the virus at a dose of 5.5 lg TCID₅₀/ml and roller bottle cultivated, and the pH of the medium was maintained at 7.0–7.4. Single freezing of the virus at a temperature of minus 60 degrees Celsius upon the completion of the cultivation cycle (during 60–72 hours) and its thawing were found to significantly increase the virus titre by 0.5 lg TCID₅₀/ml.

Key words: feline viral rhinotracheitis, virus replication, primary cell culture, continuous cell culture.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ринотрахеит кошек (Feline viral rhinotracheitis, вирусный ринит кошек, эпизоотическая кориза, герпес кошек, «сопящий трахеит») (ИРТ) – широко распространенное контагиозное заболевание, вызываемое герпесвирусом FeHV-1, относящимся к семейству *Herpesviridae*. Герпесвирусная инфекция по своей значимости занимает одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний кошек.

Синдром поражения верхних дыхательных путей впервые был выделен как самостоятельное заболевание у котят и описан в США R. A. Grandell и соавт. в 1958 г. [3, 4]. В России выделение вируса с установлением его этиологической роли было осуществлено сотрудниками ФБГУ «ВГНКИ» в 1995 г. [2].

При данном заболевании большую роль играет разработка современных высокоэффективных биопрепаратов для специфической профилактики. Изучение репродукции инфекционного ринотрахеита кошек в клеточных культурах гомологичного происхождения и оптимизация параметров культивирования являются актуальной задачей.

Целью работы было изучение культуральных и инфекционных свойств вируса ринотрахеита кошек, выращенного на гомологичных первичных и постоянных клеточных линиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали культуральный штамм «Гранд» вируса ринотрахеита кошек [2]. В опытах по изучению чувствительности различных культур клеток к вирусу ИРТ использовали как первичные и субкультуры клеток почки котенка (ПК, СПК), так

и перевиваемые культуры клеток селезенки (FS), почки (CrFK), эпителия языка (FC/Tg) и клеток эмбриона кошки, трансформированных вирусом саркомы мышей Молоди (CC-81) [1].

В качестве ростовой среды использовали питательные среды ГЛА/х, DMEM, MEM, Игла MEM с однократным и двойным набором аминокислот с добавлением 5–10% сыворотки крови плодов коровы, L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. В качестве поддерживающей среды использовали те же среды без сыворотки.

Культуру клеток выращивали в матрасах и флаконах различной емкости. Для роллерного культивирования использовали двухлитровые бутыли.

При стационарном культивировании посадочная концентрация первично-трипсинизированных культур клеток была 300 тыс. кл/мл, а перевиваемых – 70 тыс. кл/мл, при роллерном – 700 тыс. кл/мл и 150 тыс. кл/мл соответственно.

При культивировании вируса ИРТ в культурах клеток использовали среды, имеющие pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6 и 7,8.

Культуры клеток заражали вирусом из расчета $3,5 \cdot 10^5$ Ig TCID₅₀ на 1 мл суспензии.

Использовали два метода заражения культур клеток.

1. Заражение монослойной культуры клеток – вирус вносили на полностью сформированный клеточный монослой 3–5-суточных первичных и 3–4-суточных перевиваемых культур клеток. Заражение проводили без предварительной адсорбции вируса клетками или же с адсорбцией (контактом) в течение 30, 60 и 120 мин. Контакт выдерживали при температуре 37°C . После этого доливали необходимый объем поддерживающей среды. Для контроля оставляли незараженную культуру, в которой меняли только среду.

Ежедневно просматривали монослой на наличие цитопатических изменений: изменения формы клеток, наличия и степени их отторжения от стекла.

2. Заражение суспензии клеток – вирус вносили в суспензию клеток при их посадке. Контроль осуществляли, как в предыдущем описании, ежедневно оценивая характер клеточных изменений.

При заражении культур клеток для изучения динамики накопления вируса ИРТ отбирали пробы культуральной жидкости сразу после внесения вируса, а затем с интервалом 24 ч в течение всего процесса культивирования (120 ч).

Матрасы и роллерные бутыли переносили в термальную комнату или термостат для дальнейшего культивирования $((37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C})$.

Применяли два метода культивирования.

1. Роллерный метод – перемешивание осуществляли на роллерной установке Wheaton (США) в двухлитровых бутылках (Rollerbottle Cellmaster Cat. № 680060) фирмы Greiner Bio-One (Германия), которые вращали со скоростью 8–12 об/час.

2. Стационарный метод – клеточную суспензию вносили в культуральные сосуды и выращивали без перемешивания.

Матрасы укладывали горизонтально. pH среды поддерживали на уровне 7,2–7,4 с помощью гликолевого буфера. Культуры клеток, как зараженные, так и незараженные, ежедневно просматривали под микроскопом при малом увеличении на наличие или отсутствие цитопатогенного эффекта.

Инфицированные культуры клеток контролировали по интенсивности цитопатического эффекта (ЦПД). Изменения клеточного монослоя условно обозначали в крестах:

+ – появление 25% отдельных очагов клеточной дегенерации;

++ – до 50%;

+++ – до 75%;

++++ – полная дегенерация поверхности монослоя.

При наличии свыше 75% дегенерации монослоя вирусосодержащую суспензию замораживали при -60°C до следующего пассажа.

Определение инфекционной активности вируса ИРТ проводили микрометодом в 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с использованием не менее четырех параллельных рядов.

Для титрования вируса готовили 10-кратные его разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}) на поддерживающей среде. Каждым разведением вируса, начиная с 10^{-8} , заражали по четыре лунки.

Из каждой лунки с культурой удаляли ростовую среду и вносили 0,2 мл соответствующего разведения вируса. Каждым разведением вируса, начиная с 10^{-8} , заражали по четыре лунки. В качестве контроля служили незараженные четыре лунки со сформировавшимся клеточным монослоем. Результаты титрования учитывали в течение 7 сут инкубирования в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 .

Инфекционный титр вируса выражали в TCID₅₀ (50%-я тканевая цитопатическая доза) и рассчитывали по методу Рида и Менча.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по изучению чувствительности различных культур клеток к вирусу ИРТ представлены в таблице 1.

Установлено, что репродукция вируса на культурах клеток ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg носила закономерный характер. Статистически достоверных отличий, касающихся большей чувствительности какой-либо из перечисленных культур клеток к изучаемому вирусу ИРТ, не отмечено. При одинаковых условиях культивирования и заражения различия по этому показателю не превысило 0,2 lg TCID₅₀/мл.

Размножение вируса сопровождалось проявлением ЦПД. Оно наблюдалось с первого пассажа вируса и было однотипным в чувствительных культурах клеток.

Таблица 1
Инфекционная активность штамма «Гранд» вируса ИРТ кошек в гомологичных первичных и перевиваемых культурах клеток
(n = 3)

Культура клеток	Доза заражения	Количество пассажей	Титр вируса, lg TCID ₅₀ /мл
ПК	5,5 lg TCID ₅₀ /мл	5	7,44 ± 0,06
СПК		5	7,50 ± 0,10
CrFK		5	7,39 ± 0,06
FS		5	7,50 ± 0,10
CC-81		5	7,44 ± 0,06
FC/Tg		5	7,30 ± 0,17

Таблица 2

Оценка различных методов заражения и способов культивирования штамма «Гранд» вируса ИРТ кошек в культурах клеток CrFK и FS при 48–72 ч культивирования

$n = 3$

Способ культивирования	Метод заражения	Культура клеток	Доза заражения	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл
Роллерный	Монослой	CrFK	5,5 lg ТЦД ₅₀ /мл	7,71 ± 0,11
	Суспензия			5,78 ± 0,11
Стационарный	Монослой			6,61 ± 0,06
	Суспензия			5,11 ± 0,11
Роллерный	Монослой	FS		7,78 ± 0,11
	Суспензия			5,89 ± 0,22
Стационарный	Монослой			6,72 ± 0,15
	Суспензия			5,61 ± 0,06

Первые признаки характерного ЦПД, типичного для герпесвируса, отмечали через 24 ч после заражения монослоя. Оно выражалось в набухании и округлении клеток, но при сохранении целостности монослоя. Уже через 36 ч с момента заражения культуры клеток цитопатический эффект характеризовался образованием отдельных очагов больших округлых клеток. В начале процесса ЦПД имело очаговый характер, а затем диффузный. Далее происходила быстро прогрессирующая деструкция монослоя, сопровождавшаяся постепенным отторжением клеток и образованием пустот. Максимальное проявление ЦПД (свыше 75% дегенерации монослоя) и накопление вируса во всех видах культур клеток было отмечено через 48–72 ч ($7,3\text{--}7,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования культур клеток гомологичного происхождения (ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg) для культивирования в них вируса ИРТ кошек.

Дальнейшие исследования заключались в изучении инфекционной активности вируса ИРТ и сроков максимального накопления в культурах клеток, влияния на эти показатели способа заражения и метода культивирования, дозы заражения, срока предварительной

адсорбции заражающего вируса, значения pH среды и влияния способа замораживания и размораживания вирусосодержащих жидкостей с целью выделения вируса из зараженных клеток.

Результаты сравнительного изучения инфекционной активности вируса ИРК, выращенного в роллерных и стационарных условиях, в зависимости от метода культивирования и способа заражения, представлены в таблице 2.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что накопление вируса зависело от используемого метода культивирования и способа заражения клеток.

Титр вируса был максимальным при заражении монослойных культур клеток. В частности, в клеточных линиях CrFK и FS при роллерном культивировании он составил $7,71 \pm 0,11$ и $7,78 \pm 0,11 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, в стационарных условиях $6,61 \pm 0,06$ и $6,72 \pm 0,15 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ соответственно. Заражение суспензии клеток тех же линий не позволило получить сбора вируса с титром, превышающим названные показатели: при роллерном культивировании он составил $5,78 \pm 0,11$ и $5,89 \pm 0,22 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, а при стационарном – $5,11 \pm 0,11$ и $5,61 \pm 0,06 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ соответственно. Полноценный монослой при этом не сформировался.

Таблица 3

Динамика накопления штамма «Гранд» вируса ИРТ кошек в зависимости от дозы заражения и времени культивирования в постоянной линии клеток CrFK

Доза заражения $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$	Показатели	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$			
		Срок культивирования, ч			
		48	72	96	120
5,5	$M \pm m$	$7,00 \pm 0,14$	$7,10 \pm 0,08$	$6,92 \pm 0,16$	$6,54 \pm 0,08$
	p	$> 0,5$	контроль	$> 0,4$	$> 0,005$
4,5	$M \pm m$	$6,67 \pm 0,10$	$6,75 \pm 0,08$	$6,63 \pm 0,04$	$6,42 \pm 0,05$
	p	$> 0,5$	контроль	$> 0,2$	$> 0,01$
3,5	$M \pm m$	$5,37 \pm 0,10$	$5,84 \pm 0,10$	$6,38 \pm 0,13$	$6,08 \pm 0,02$
	p	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$

Таблица 4
Влияние предварительной адсорбции на накопление штамма «Гранд» вируса ИРТ в культуре клеток CrFK при 60–72 ч культивирования
 $n = 4$

Показатели	Время адсорбции, мин			
	Без адсорбции (контроль)	30	60	120
Доза заражения	5,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл			
Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл $M \pm m$	6,54 ± 0,04	6,59 ± 0,05	7,00 ± 0,14	7,08 ± 0,16
p	–	> 0,4	> 0,01	> 0,01

Таблица 5
Репродукция штамма «Гранд» вируса ИРТ в культуре клеток CrFK при различных значениях pH среды
 $n = 3$

Значение pH среды	Доза заражения	Накопление вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл	Существенность различий (p)
6,8	5,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл	5,61 ± 0,06	< 0,001
7,0		7,00 ± 0,19	> 0,5
7,2 (контроль)		7,00 ± 0,19	–
7,4		7,11 ± 0,11	> 0,5
7,6		5,89 ± 0,11	< 0,005

Изучение динамики накопления вируса ИРТ в зависимости от дозы заражения и времени культивирования в клетках CrFK проводили далее с интервалом 24 ч в течение 4 сут (табл. 3).

Анализ полученных результатов показал, что титр накопления вируса тем выше, чем больше доза заражающего вируса. Следует отметить, что срок максимального накопления вируса при минимальной дозе заражения (3,5 Ig ТЦД₅₀/мл) сдвинулся до 4 сут. Таким образом, было показано, что доза заражения влияла главным образом на время накопления максимального количества вируса. Доза вируса 5,5 Ig ТЦД₅₀/мл обеспечивала накопление вируса ИРТ через 48–72 ч культивирования в пределах (7,0 ± 0,14)–(7,1 ± 0,08) Ig ТЦД₅₀/мл.

Немаловажное значение в оптимальной репродукции вирусов животных имеет фактор предварительного контакта (адсорбции) вируса с монослоем исследуемых клеточных линий. В настоящей работе было изучено влияние времени контакта (адсорбции) концентрата штамма «Гранд» вируса ИРТ с монослоем культуры клеток CrFK.

Результаты опытов представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы, культивирование вируса без предварительной адсорбции клетками и после 30-минутной адсорбции сопровождалось невысоким накоплением вируса, не превышающим (6,54 ± 0,04)–

(6,59 ± 0,05) Ig ТЦД₅₀/мл. Тогда как адсорбция вируса клетками в течение 60–120 мин обеспечивала максимальное накопление вируса в титрах (7,00 ± 0,14)–(7,08 ± 0,16) Ig ТЦД₅₀/мл.

Общеизвестно, что выбор оптимального pH среды обеспечивает благоприятные условия для размножения вирусов в клетках. Значения pH среды для разных вирусов варьируют в достаточно широком диапазоне в зависимости от типа клеток (от 6,8 до 7,6).

Было установлено, что поддерживающая среда со значениями pH от 7,0 до 7,4 обеспечивает размножение вируса ИРТ в культуре клеток CrFK в наибольших титрах (табл. 5).

При проведении исследований было установлено, что однократное замораживание культурального вируса при температуре –60 °C по окончании цикла культивирования (в течение 60–72 ч) достоверно повышало его титр на 0,5 Ig ТЦД₅₀/мл. При 2–3-кратном замораживании и оттаивании титр вируса почти не изменялся.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первичные и субкультуры клеток почек котят, перевиваемые клеточные линии CrFK, FS, CC-81, FC/Tg в равной степени чувствительны и пригодны для культивирования вируса инфекционного ринотрахеита кошек, где он реплицируется с проявлением выраженного ЦПД.

– Накопление вируса было максимальным ((7,71–7,78 ± 0,11) Ig ТЦД₅₀/мл) при следующих условиях:

- заражение монослойных культур клеток;
- культивирование роллерным методом;
- поддержание pH среды в пределах от 7,0 до 7,4;
- доза заражения 5,5 Ig ТЦД₅₀/мл;
- предварительная адсорбция вируса клетками в течение 60–120 мин;
- время культивирования 48–72 ч;
- однократное замораживание при –60 °C и размораживание вирусного сбора по окончании цикла культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каталог. Российская коллекция клеточных культур (РККК) / ред. коллегия: Г. П. Пинаев, Г. Г. Полянская, Г. А. Сакута, М. С. Богданова. – СПб., 2004. – 315 с.
2. Ринотрахеит кошек / Э. И. Элизбарашвили, М. М. Рахманина, В. И. Уласов, Ю. И. Могильный // Ветеринария. – 1995. – № 9. – С. 50–52.
3. Crandell R. A., Madin S. H. Experimental studies on a new feline virus // Am. J. Vet. Res. – 1960. – Vol. 21. – P. 551–556.
4. Crandell R. A., Maurer F. D. Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1958. – Vol. 97, No. 3. – P. 487–490.

REFERENCES

1. Catalogue. Russian cell culture collection (RCCC). Ed. G. P. Pinayev, G. G. Polyanskaya, G. A. Sakuta, M. S. Bogdanova. SPb., 2004 (in Russian).
2. Feline rhinotracheitis. E. I. Elizbarashvili, M. M. Rakhmanina, V. I. Ulasov, Yu. I. Mogilny. Veterinariya. 1995; 9: 50–52 (in Russian).
3. Crandell R. A., Madin S. H. Experimental studies on a new feline virus. Am. J. Vet. Res. 1960; 21: 551–556.
4. Crandell R. A., Maurer F. D. Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958; 97 (3): 487–490.

Поступила 16.07.18

Принята в печать 16.08.18

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 представлена 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

Телефоны: +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»)**

FGBI "FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH" (FGBI "ARRIAN")

Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру
OIE Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease

**Референтная лаборатория МЭБ по высокопатогенному и низкопатогенному
гриппу птиц и ньюкаслской болезни**

The OIE Reference Laboratory for Highly Pathogenic Avian Influenza and Low Pathogenic
Avian Influenza (Poultry) and Newcastle Disease

**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, гемофильно-го полисерозита свиней, актинобациллезной плеввропневмонии 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 коронавируса 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 мер 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**