



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



**ПРИМЕНЕНИЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ
ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА
ЯЩУРА В МОЛОКЕ КРС**
с. 22

**USE OF REAL-TIME qRT-PCR
FOR FMD VIRUS DETECTION
IN CATTLE MILK**
p. 26



**РИСК ЗАНОСА ОСОБО ОПАСНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ
С ВЕЗИКУЛЯРНЫМ СИНДРОМОМ
НА ТЕРРИТОРИЮ РОССИИ**
с. 3

**RISK OF INTRODUCING HIGHLY
DANGEROUS ANIMAL VESICULAR
DISEASES INTO THE RUSSIAN
FEDERATION**
p. 10



**МОНИТОРИНГ
СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ
В СЫРОМ МОЛОКЕ КОРОВ**
с. 29

**MONITORING OF CALCIUM
CONTENT OF RAW COW MILK**
p. 29

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, Анастасия Мазнева

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 Lavrukhina, Anastasia Mazneva

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

Кузьминова 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

Настасиевич Иван — доктор ветеринарных наук, Институт гигиены и технологии мяса, Белград, Сербия

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

Самарджия Марко — доктор ветеринарных наук, профессор, Загребский университет, г. Загреб, Хорватия

Сидорчук А. А. — доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва

Соколович Марьяна — 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-ВНИИВ», г. Казань, Россия

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

Editorial council:

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

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

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

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

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

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

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

Nastasijevic I. — PhD/DVM, Associate Director, Head of Technology Development and Transfer Department, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia

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

Samardžija M. — PhD/DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Sidorchuk A. A. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow

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: Виктория Черепанова

Design and composition: Maria Bondar
Proof-reader: Victoria Cherepanova

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, FGBRI 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



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

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



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

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



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

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



Метлин А. Е. — доктор 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 ВНИИБП, г. Щелково

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



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

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



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

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



Субботин А. М. — доктор биологических наук, профессор, член Коллегии (министр) по промышленности и агропромышленному комплексу Евразийской экономической комиссии

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



Чвала И. А. — кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

Chvala I. A. — Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research and Monitoring, FGBI "ARRIAH", Vladimir



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

Shakhov A. G. — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, RAS Associate Member, GNU VNIVIPAT 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 «Полиграфический комплекс», 123298 г. Москва, ул. 3-я Хоросhevская, д. 18, корп. 1

Подписано в печать 18 марта 2019 года
Дата выхода 25.03.2019

Printing Office:

ООО "Poligrafichesky Complex" 123298 Moscow, 3-ya Khoroshevskaya ul. 18, build. 1

Approved for print 18 march 2019
Issued: 25.03.2019

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

- 3** В. П. Семакина, Т. П. Акимова, И. Ю. Соломатина, А. К. Караулов
РИСК ЗАНОСА ОСОБО ОПАСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ
С ВЕЗИКУЛЯРНЫМ СИНДРОМОМ НА ТЕРРИТОРИЮ РОССИИ

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ КРС

- 16** Я. Е. Пестова, А. В. Кононов, А. В. Спрыгин
ЭНТОМОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭПИЗООТОЛОГИИ ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО
ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

- 22** А. М. Тимина, С. Н. Фомина, Т. К. Майорова
ПРИМЕНЕНИЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ВИРУСА ЯЩУРА В МОЛОКЕ КРС

- 29** Е. С. Кандинская, С. В. Редькин, Г. В. Чебакова
МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ В СЫРОМ МОЛОКЕ КОРОВ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

- 34** Д. В. Гадзевич, С. И. Данильченко, С. Г. Ерофеев, М. А. Пасунькина,
А. Б. Гринченко, В. Н. Ирза, М. С. Волков, А. В. Варкентин
ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ГРИППА ПТИЦ
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

- 39** Ч. К. Фома, Т. С. Катаева
ВИДОВОЙ СОСТАВ И СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЭКТОПАРАЗИТОВ
ДОМАШНИХ КУР НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БИОТЕХНОЛОГИЯ

- 43** Д. А. Лозовой, М. И. Доронин, В. А. Стариков, Д. В. Михалишин,
А. А. Шишкова, А. М. Тимина, А. В. Борисов
ВАЛИДАЦИЯ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПОСРЕДОВАННОЙ ОЦЕНКИ ТИТРА
ВИРУСА ЯЩУРА

- 51** М. Н. Гусева, М. И. Доронин, М. А. Шевченко,
Д. В. Михалишин, А. А. Шишкова
ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ГИДРОЛИЗАТА
БЕЛКОВ КРОВИ

- 58** В. С. Русалеев, О. В. Прунтова, Д. А. Васильев
КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

- 63** В. В. Макаров, Н. Я. Махамат
ГЛОБАЛЬНАЯ ЭПИЗООТОЛОГИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ.
2. ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЧЕЛОВЕКА КАК ИНДИКАТОР ЭПИЗООТИЧЕСКОГО
НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ И ФАКТОРЫ РИСКА

НОВОСТИ

- 68** Некролог В. И. Диев

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

- 10** V. P. Semakina, T. P. Akimova, I. Yu. Solomatina, A. K. Karaulov
RISK OF INTRODUCING HIGHLY DANGEROUS ANIMAL VESICULAR DISEASES
INTO THE RUSSIAN FEDERATION

REVIEWS | BOVINE DISEASES

- 16** Ya. E. Pestova, A. V. Kononov, A. V. Sprygin
ENTOMOLOGICAL ASPECTS OF LUMPY SKIN DISEASE EPIZOOTOLOGY
(REVIEW)

ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

- 26** A. M. Timina, S. N. Fomina, T. K. Mayorova
USE OF REAL-TIME qRT-PCR FOR FMD VIRUS DETECTION IN CATTLE MILK

- 29** Ye. S. Kandinskaya, S. V. Redkin, G. V. Chebakova
MONITORING OF CALCIUM CONTENT OF RAW COW MILK

ORIGINAL ARTICLES | AVIAN DISEASES

- 34** D. V. Gadzevich, S. I. Danilchenko, S. G. Yerofeyev, M. A. Pasunkina,
A. B. Grinchenko, V. N. Irza, M. S. Volkov, A. V. Varkentin
EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF AVIAN INFLUENZA
IN THE REPUBLIC OF CRIMEA

- 39** Ch. K. Foma, T. S. Katayeva
ECTOPARASITE SPECIES COMPOSITION AND SEASONAL DYNAMICS
IN DOMESTIC FOWL IN THE KRASNODAR KRAI

ORIGINAL ARTICLES | BIOTECHNOLOGY

- 43** D. A. Lozovoy, M. I. Doronin, V. A. Starikov, D. V. Mikhailishin,
A. A. Shishkova, A. M. Timina, A. B. Borisov
VALIDATION OF REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE
CHAIN REACTION FOR INDIRECT ASSESSMENT OF FMD VIRUS TITRE

- 51** M. N. Guseva, M. I. Doronin, M. A. Shevchenko, D. V. Mikhailishin, A. A. Shishkova
EVALUATION OF SUITABILITY OF METHODS FOR TESTING BLOOD PROTEIN
HYDROLYSATES FOR THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY AND TOXICITY

- 58** V. S. Rusaleyev, O. V. Pruntova, D. A. Vasilyev
CULTURAL MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS
OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS

ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

- 63** V. V. Makarov, N. Ya. Makhamat
ANTHRAX GLOBAL EPIZOOTOLOGY. 2. DISEASE INCIDENCE IN HUMANS
AS INDICATOR OF EPIZOOTIC AND RISK FACTORS

NEWS

- 68** Obituary notice
V. I. DIYEV

РИСК ЗАНОСА ОСОБО ОПАСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ С ВЕЗИКУЛЯРНЫМ СИНДРОМОМ НА ТЕРРИТОРИЮ РОССИИ

В. П. Семакина¹, Т. П. Акимова², И. Ю. Соломатина³, А. К. Караулов⁴

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

² Ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: akimova@arriah.ru

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

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

РЕЗЮМЕ

Болезни животных с везикулярным синдромом (везикулярные болезни) имеют довольно широкое распространение в мире. Трансграничные везикулярные болезни в основном регистрируют в странах Африки и Азии. В первую очередь к их числу относятся ящур, оспа овец и коз, чума мелких жвачных, заразный узелковый дерматит (нодулярный дерматит) крупного рогатого скота, везикулярная болезнь свиней, везикулярный стоматит, а также относительно новая сенекавирусная везикулярная инфекция. Основными причинами трансграничного распространения везикулярных болезней являются: законное и незаконное передвижение животных, продуктов животного происхождения, кормов, живых вакцин; миграция диких животных через границы соседних государств; пассивная механическая передача инфекции. Риск заноса возбудителей везикулярных болезней на территорию Российской Федерации при легальном импорте живых животных минимальный. Наибольшую вероятность представляет занос возбудителя при легальном импорте животноводческой продукции в случае распространения болезней в следующих государствах: Китае, Турции, Индии, Монголии, Иране, Казахстане и др. Правонарушения во внешней торговле представляют прямую угрозу для эпизоотической обстановки в России и экономической безопасности нашей страны. Существует вероятность заноса возбудителей везикулярных болезней с импортируемыми в страну кормами для животных, так как некоторые вирусы потенциально могут выживать в течение длительного времени в некоторых ингредиентах. Исходя из неблагополучия по везикулярным болезням животных некоторых близлежащих к Российской Федерации государств, сохраняется угроза заноса инфекций на территорию страны при миграции диких животных по трем направлениям: северокавказскому, центральноазиатскому и дальневосточному.

Ключевые слова: ящур, оспа овец и коз, чума мелких жвачных, заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота, везикулярная болезнь свиней, везикулярный стоматит, сенекавирусная везикулярная инфекция.

ВВЕДЕНИЕ

Везикулярные болезни – это общий термин, относящийся к инфекциям, которые проявляются образованием везикул, папул и пустул на различных органах больного животного. Самой опасной, высококонтагиозной, имеющей исключительное значение для экономики, продовольственной безопасности и торговли между странами болезнью данной категории является ящур. Вспышки ящура способны охватывать большие территории, целые страны и даже континенты, что обусловлено широким спектром восприимчивых домашних и диких животных, множественностью путей выделения вируса больными животными и его высокой сохранностью во внешней среде и продуктах животного происхождения. Эта болезнь встречается во многих странах мира, и всегда существует вероятность заноса вируса на ранее благополучные территории, в том чис-

ле в благополучные регионы Российской Федерации. Поэтому надзорными органами страны вводятся ограничения на импорт животных и продуктов животного происхождения из неблагополучных по ящуру районов.

К наиболее значимым болезням, от которых следует дифференцировать ящур, Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) отнесла везикулярный стоматит, везикулярную болезнь свиней, оспу овец и коз, чуму мелких жвачных, а также заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота. Согласно Международной классификации заразных болезней животных, они относятся к категории трансграничных, то есть «имеют потенциал для быстрого распространения, независимо от государственных границ, сопровождаются серьезными последствиями в области общественной

экономики и здравоохранения и имеют большое значение в международной торговле животными и продуктами животного происхождения».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При оценке риска использована информация МЭБ о вспышках особо опасных везикулярных болезней животных в странах мира. Поиск дополнительной информации осуществлен с помощью баз данных Федеральной таможенной службы, отчетов ветеринарных служб, а также данных средств массовой информации. В работе представлена качественная оценка риска заноса болезней животных с везикулярным синдромом на территорию Российской Федерации.

В соответствии с определением МЭБ (Кодекс здоровья наземных животных, в редакции 2017 г.) оценка рисков – это определение вероятности, а также биологических и экономических последствий заноса какой-либо опасности в импортирующую страну, фиксации и распространения этой опасности на ее территории.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Болезни с везикулярным синдромом

К числу болезней с везикулярным синдромом в первую очередь относятся ящур, оспа овец и коз (ООК), чума мелких жвачных (ЧМЖ), заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (ЗУД), везикулярная болезнь свиней (ВБС), везикулярный стоматит (ВС), а также сенекавирусная везикулярная инфекция (СВВИ).

Согласно статье 1.4.6 Кодекса здоровья наземных животных, по *везикулярной болезни свиней и везикулярному стоматиту* Российская Федерация имеет статус исторического благополучия, так как ВС никогда не регистрировали на территории нашей страны, а случаи ВБС не регистрировали с 1975 г. [1]. С 2015 г. ВС и ВБС исключены из списка МЭБ. Основанием для этого послужило отсутствие естественной передачи вируса человеку, а также отсутствие значительной заболеваемости и смертности у домашних или диких животных. В мире регистрируют единичные случаи ВБС (за последние 10 лет известна информация только о случаях заболевания животных в Италии). Спорадические вспышки ВС происходят на Американском континенте.

Территория России является исторически благополучной по *чуме мелких жвачных*, однако в последние годы эпизоотологи все чаще прогнозируют возможный занос инфекции в нашу страну. Это объясняется близким расположением неблагополучных по ЧМЖ азиатских регионов к границам Российской Федерации, а также тесными торгово-экономическими отношениями с этими странами. Причиной трансграничного распространения ЧМЖ может быть как законное, так и незаконное перемещение инфицированных животных и продуктов животного происхождения, а также миграция диких животных через границы соседних государств. Соответственно, наибольшее внимание ветеринарной службы Российской Федерации направлено на эпизоотическую ситуацию в сопредельных с ней странах, таких как Китай, Монголия, Казахстан, Грузия, а также в странах, имеющих близкое географическое расположение с Россией: Турции, Болгарии, Афганистане, Иране и др. Анализ эпизоотической ситуации в мире по ЧМЖ показывает, что наибольшая вероятность возникновения вспышек заболевания на территории России существует в пределах Северо-Кавказ-

ского, Южного и Приволжского федеральных округов с высокой плотностью восприимчивых животных.

Оспа овец и коз распространена в африканских и европейских странах, в Российской Федерации заболевание регистрируют периодически. Болезнь наносит ущерб экономике многих стран, затрудняет развитие животноводческого сектора, снижает производительность и препятствует торговле животными и продуктами животного происхождения. Китай, Монголия, Казахстан, где вспышки ООК регистрируют из года в год, являются приграничными для Российской Федерации странами, что создает угрозу дальнейшего распространения данного заболевания по территории нашей страны.

С 2016 по 2018 г. было зарегистрировано 49 неблагополучных по *заразному узелковому дерматиту крупного рогатого скота* стран: 33 – африканских, 7 – азиатских, 9 – европейских. Заболевание официально не зарегистрировано на Американском континенте, в Австралии и странах Океании. С 2013 г. отмечалось быстрое распространение ЗУД по всему Ближнему Востоку и Центральной Азии. На территории Российской Федерации вспышки заболевания впервые зарегистрированы в июле 2015 г.

Риск дальнейшего распространения ЗУД в регионах Российской Федерации высокий, особенно на территории Северо-Кавказского, Южного, Центрального и Приволжского федеральных округов. Это может привести к серьезным социально-экономическим последствиям для отечественного животноводства.

Существует большой риск заноса ЗУД в благополучные страны Восточной Европы и на Балканы. В связи с этим для предотвращения и контроля распространения инфекции Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО) призывает к широкомасштабной вакцинации крупного рогатого скота, особенно в преддверии сезонной активности кровососущих насекомых, когда показатели инфицирования самые высокие [15].

Из всех везикулярных болезней наибольшую угрозу для России представляет ящур, который имеет тенденцию к быстрому распространению на большие географические территории и проходит в виде эпизоотий и панзоотий. Ящур является болезнью, которую в первую очередь необходимо исключать при везикулярном проявлении инфекции. Вирус ящура может быть занесен из эндемичных регионов даже в экономически развитые страны. При этом ящур способен наносить животноводству страны большой экономический ущерб.

Примером является вспышка ящура в 2001 г. в Великобритании, где болезнь была отмечена на территории 13 графств, зарегистрировано 2026 ящурных очагов и уничтожено более 6 млн животных. Общий экономический ущерб от вспышки по разным оценкам составил от 5,8 до 8,6 млрд фунтов стерлингов, что эквивалентно примерно 10,7–14 млрд долларов США [20]. Наглядным доказательством значимости ящура как особо опасной инфекции, способной к быстрому и широкомасштабному распространению, служит вспышка, произошедшая на территории Тайваня в 1997 г. Экономический ущерб оценен в 379 млн долларов США из-за уничтожения более 4 млн свиней, что составило примерно 40% популяции свиней страны. С учетом потерь от запрета экспорта свинины и неполучения прибыли от туризма общий ущерб был оценен в 1,6 млрд долларов США [18].

В Японии в 2010 г. широкомасштабная эпизоотия ящура вызвала серьезные экономические последствия для животноводства и смежных отраслей. Прямые затраты на животноводческую отрасль составили 51,2 млрд японских иен, косвенные расходы на смежные отрасли – 25,5 млрд иен, расходы на мероприятия по борьбе с болезнью – 8,2 млрд иен. Общее влияние эпизоотии ящура на экономику оценили почти в 85 млрд иен, или 934 млн долларов США по курсу на 2010 г. [17].

Ежегодный экономический ущерб от ящура, слагаемый из видимых производственных потерь и вакцинации, только в эндемичных странах составляет от 6,5 до 21 млрд долларов США. Кроме того, вспышки ящура в странах и зонах, свободных от болезни, вызывают убытки в размере 1,5 млрд долларов США в год [20].

На территории РСФСР ящур был искоренен в 1989 г. Основой эрадикации заболевания стало профилактическое применение вакцинных препаратов, политика полного санитарного уоя (stamping out) восприимчивых животных в очаге и кольцевая вакцинация вокруг него. Впервые после искоренения ящура на территории России заболевание возникло в 1993 г. С этого времени вспышки в основном регистрируют вдоль южных границ страны. С учетом того факта, что территории ряда окружающих стран и регионов (в первую очередь Китая, Монголии, стран Ближнего Востока и Центральной Азии) остаются неблагополучными по ящуру, постоянная угроза заноса вируса на территорию России сохраняется. Для противодействия этому в приграничных с неблагополучными странами регионах России создана зона постоянной профилактической иммунизации животных, в которой применяется система целевого эпизоотического надзора за ящуром.

Сравнительно недавно (в 2007 г.) появилась информация о новом вирусе, вызывающем заболевание животных с везикулярным синдромом – *сенекавирусную везикулярную инфекцию*. С конца 2014 г. наблюдается увеличение регистраций вспышек СВВИ у свиней в разных категориях производства. За 3 года (с ноября 2014 г. по ноябрь 2017 г.) случаи сенекавирусной инфекции зарегистрированы в 6 странах: США, Бразилии, Канаде, Колумбии, Китае, Таиланде. По клиническим признакам сенекавирусную инфекцию у взрослых свиней и поросят на откорме трудно отличить от ящура и других везикулярных болезней. К тому же сенекавирус крайне устойчив во внешней среде и выживает при различных условиях [23].

Выявлен высокий риск заноса в Российскую Федерацию сенекавируса с инфицированными племенными свиньями, продуктами уоя, контаминированными вирусом, фекальной сывороткой, трипсином и культурами клеток, а также вирусвакцинами [13].

Оценка риска

Отечественный и мировой опыт свидетельствует о том, что наиболее распространенные пути и причины заноса большинства возбудителей болезней с везикулярным синдромом в любые благополучные зоны (страны) – это:

I. Импорт живых животных и продуктов животного происхождения.

II. Импорт кормов, вакцин и ветеринарно-фармакологических препаратов, изготовленных с нарушением технологии изготовления.

III. Миграция диких животных.

IV. Механический путь (автотранспорт, туристы, паломники, мигранты, насекомые).

I. Импорт живых животных и продуктов животного происхождения

Так как Россия закупает из-за границы живых животных и продукты животного происхождения, существует определенная степень риска заноса возбудителей этих болезней на территорию страны как законным путем (при импорте из стран – торговых партнеров), так и незаконным, например, при нелегальном перемещении животных в приграничных районах. Также перенос может осуществляться во время миграции диких животных, при контакте домашних и диких животных на пастбищах и водопоях. Причем, имея самую длинную сухопутную границу, Российская Федерация находится под постоянной угрозой заноса различных возбудителей трансграничных болезней животных. Подтверждением этому является занос вирусов заразного узелкового дерматита и африканской чумы свиней на территорию России из стран Закавказья.

Определенный риск ввоза в страну возбудителей заболеваний существует при импорте восприимчивых животных, мяса, а также шкур, кишечного сырья, костей, рогов, копыт и шерсти.

Некоторую озабоченность вызывает регистрация очагов ящура, заразного узелкового дерматита, оспы овец и коз, чумы мелких жвачных в период с 2015 по 2018 г. в странах, с которыми Российская Федерация имеет близкое географическое расположение или/и торговые отношения в области сельского хозяйства (Грузия, Монголия, Китай и др.).

1. Легальный импорт живых животных

Риск заноса возбудителей классических везикулярных болезней на территорию Российской Федерации при легальном импорте живых животных минимальный, так как Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору следит за эпизоотической ситуацией в мире и в случае регистрации вспышек в странах – торговых партнерах вводит временные ограничения на поставки товаров, представляющих опасность.

В 2017 г. – мае 2018 г. в первую двадцатку стран, поставляющих наибольшее количество живых животных в Россию, входили европейские государства, а также Канада, США и Узбекистан (табл. 1).

Все эти страны благополучны по ящуру, оспе овец и коз, чуме мелких жвачных и заразному узелковому дерматиту. Однако следует отметить, что в Канаде и США регистрируют случаи заболевания животных сенекавирусной везикулярной инфекцией. В списке поставщиков живого крупного рогатого скота в Россию в 2017–2018 гг. был Казахстан, где в 2016 г. регистрировали вспышку ЗУД КРС.

2. Легальный импорт продуктов животного происхождения

В таблице 2 указаны страны, которые, по данным таможенной статистики внешней торговли РФ на 2018 г., импортируют животноводческую продукцию в Россию и неблагополучны по болезням с везикулярным синдромом.

Среди продукции животноводства высокая доля импорта традиционно приходится на сливочное масло, сыр, творог и мясо крупного рогатого скота, которые при несоблюдении ветеринарно-санитарных

Таблица 1
Импорт живых животных на территорию России [16]

Страна	Доля импорта, %	Доля импорта по видам животных, %					
		лошади, ослы, мулы	крупный рогатый скот	свиньи	овцы, козы	домашняя птица	прочие живые животные
Нидерланды	27,0	0,4	68,0	—	0,1	28,2	3,3
Германия	21,1	0,7	85,8	—	0,2	13,0	0,3
Австралия	15,7	—	77,2	—	22,8	—	—
Венгрия	8,8	0,4	84,1	—	0	15,5	—
Дания	7,9	0,1	99,9	—	—	—	0
Канада	3,7	0,9	1,9	97,1	—	—	0
Франция	3,3	3,1	14,3	—	—	69,1	13,6
США	2,2	33,9	58,9	—	1,1	0,3	5,9
Республика Беларусь	1,5	3,0	49,3	21,8	0,1	20,6	5,2
Австрия	1,3	0	72,6	—	6,8	20,6	0
Англия	1,2	9,4	—	—	—	61,7	29,0
Ирландия	0,8	51,8	48,2	—	—	—	—
Узбекистан	0,7	—	—	—	—	—	100,0
Украина	0,7	1,1	28,1	—	—	—	70,8
Бельгия	0,6	2,9	—	—	—	—	97,1
Израиль	0,6	0,7	—	—	—	—	99,3
Чехия	0,5	0,5	36,2	—	—	44,4	18,9
Финляндия	0,4	0,8	99,2	—	—	—	0
Эстония	0,4	0,3	99,7	—	—	—	—
Словакия	0,4	—	10,4	—	—	—	89,6

правил могут являться факторами распространения инфекции.

Таким образом, можно предположить, что при легальном импорте наибольшую угрозу РФ в отношении возможности заноса возбудителей везикулярных болезней представляет распространение их в следующих государствах: Китае, Турции, Индии, Монголии, Иране, Казахстане и др.

3. Нелегальный ввоз живых животных и животноводческой продукции

Факты незаконного перемещения через таможенную границу животноводческой продукции и живых животных фиксируют ежегодно. Угрозу для эпизоотической обстановки, существующую в отношении везикулярных болезней, представляют случаи нелегального ввоза из Казахстана, Китая, Монголии, Кыргызстана. В таблице 3 приведены сведения о попытках ввоза потенциально опасной в ветеринарно-санитарном отношении продукции животного происхождения и живых животных через государственную границу РФ по данным средств массовой информации за 2018 г.

Судя по фактам, публикуемым средствами массовой информации России, число нарушений норм международного права и российского законодательства в этой сфере не сокращается. Правонарушения во внешней торговле представляют прямую угрозу для эпизоотической обстановки в России и экономической безопасности нашей страны.

II. Импорт кормов, живых вакцин и ветеринарных фармпрепаратов

Потенциальную угрозу заноса возбудителей болезней на территорию Российской Федерации представляет также импорт кормов для животных. Для ввоза на таможенную территорию Евразийского экономического союза корма и кормовые добавки животного происхождения должны быть свободны от губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота и скрепи овец, африканской чумы свиней, чумы лошадей, чумы крупного рогатого скота, классической чумы свиней, ООК, орнитоза, сибирской язвы, гриппа лошадей, гриппа птиц и ньюкаслской болезни. Однако исследователи из

Таблица 2
Импорт животноводческой продукции на территорию России в 2018 г. [14]

Страна	Импортируемые продукты	Болезнь			
		ящур	ЗУД	ОБК	ЧМЖ
Армения	молоко, сливки, сливочное масло, сыры, творог, необработанные шкуры крупного рогатого скота		+		
Болгария	шерсть и волос животных		+	+	+
Китай	мясо и пищевые мясные субпродукты, щетина свиная или кабанья, продукты животного происхождения, шерсть и волос животных	+		+	+
Колумбия	мясо крупного рогатого скота, пищевые субпродукты крупного рогатого скота, свиней, овец, коз, сливочное масло	+			
Египет	сыры и творог	+	+	+	+
Греция	продукты животного происхождения не для употребления в пищу		+		
Индия	мясо крупного рогатого скота замороженное	+			+
Иран	молоко, сливки, сливочное масло, сыры и творог	+	+	+	+
Южная Корея	продукты животного происхождения, дубленая кожа из шкур животных	+			
Казахстан	мясо крупного рогатого скота, пищевые субпродукты крупного рогатого скота, молоко, сливки, сливочное масло, сыры и творог, необработанные шкуры крупного рогатого скота, шерсть		+		
Марокко	сыры и творог			+	
Монголия	мясо крупного рогатого скота замороженное, шерсть и волос животных	+		+	+
Непал	дубленая кожа из шкур крупного рогатого скота	+		+	+
Тунис	сыры и творог	+		+	+
Турция	сыры и творог, дубленая кожа из шкур овец или шкурок ягнят, шерсть	+	+	+	+
ЮАР	продукты животного происхождения	+	+		

+ – неблагополучие по болезни (согласно Кодексу здоровья наземных животных, сроки установления благополучия: для ящура – 12 месяцев, для ЧМЖ – 24 месяца, для ЗУД и ОБК – 36 месяцев отсутствия очагов).

США обнаружили, что некоторые вирусы, в том числе возбудитель СБВИ, потенциально могут выживать в течение длительного времени в некоторых ингредиентах кормов. Сенекавирус А показал себя как довольно жизнеспособный вирус, который сохранялся во всех исследуемых кормовых компонентах. Таким образом, было доказано, что определенные ингредиенты кормов могут представлять риск с точки зрения перемещения вирусов между фермами и между различными странами мира [22].

На территорию России осуществляется импорт вакцинных препаратов, в том числе живых вакцин, которые в случае нарушения технологии изготовления могут представлять потенциальную угрозу заноса возбудителей болезней. Следует учитывать также возможность контаминации трипсина, сыворотки крови и компонентов вакцин, которые импортируют в нашу страну в качестве сырья для изготовления отечественных препаратов.

Хотя живые вакцины составляют небольшой процент из всех зарегистрированных на территории России зарубежных лекарственных препаратов для ветеринарного применения, они могут оказаться при-

чинами возникновения случаев заболевания животных, в том числе везикулярных болезней.

III. Миграция диких животных

Источниками инфекций могут служить дикие животные, особенно во время их передвижения через государственные границы. Дикие жвачные могут заражаться от домашних и в свою очередь служить источником возбудителей инфекционных болезней для сельскохозяйственных животных. Циркуляция возбудителя той или иной инфекции в дикой природе создает опасность заражения сельскохозяйственных продуктивных животных, особенно при наличии общих пастбищ и водопоев. При отгонном животноводстве пути миграции диких животных могут пересекать сельскохозяйственные пастбища или зоны выращивания зеленых кормов [11].

Исходя из неблагополучия некоторых близлежащих к России государств по классическим везикулярным болезням животных, сохраняется угроза заноса инфекций на территорию Российской Федерации по трем направлениям: северокавказскому, центрально-азиатскому и дальневосточному. Так, практически ежегодно российская ветеринарная служба регистрирует

Таблица 3
Нелегальные поставки животных и животноводческой продукции в Россию

Страна	Продукт	Ссылка на источник
Казахстан	рыбные и мясные консервы	http://www.vzsar.ru/news/2018/07/06/konservy-bez-dokumentov-razvernuli-na-granice-v-ozinkah.html
Казахстан	мелкий рогатый скот	http://www.fsvps.ru/fsvps/news/27293.html
Казахстан	сыр	https://fn-volga.ru/news/view/id/86855
Казахстан	молочная продукция	http://www.fsvps.ru/fsvps/news/26991.html
Казахстан, Кыргызстан	консервы мясные, мясо птицы, говядина	https://fn-volga.ru/news/view/id/86855
Кыргызстан	кисломолочная продукция	https://www.alt.kp.ru/online/news/3188407/
Китай	мясо	https://www.hab.kp.ru/online/news/3057201/
Китай	колбасная продукция	http://www.rshn-khv-eao.ru/novosti/46-pogranichnyj-veterinarnyj-kontrol/1412-zapreshchennye-produkty-zaderzhani-na-granice
Монголия	вареная баранина	https://www.baikal-daily.ru/news/16/322825/
Монголия	мясные изделия	https://www.infpol.ru/88349-v-buryatii-zaderzhali-grazhdanina-kotoryy-pytalsya-provezti-iz-mongolii-zapreshchennoe-myaso/
Монголия	говядина	https://www.baikal-daily.ru/news/16/313221/
Узбекистан	мясо и молочная продукция	https://www.vrn.kp.ru/online/news/3186597/
Узбекистан, Таджикистан	молоко	https://ru.sputnik-tj.com/russia/20180728/1026312797/cplyata-vnukovo-yashchur-uzbekistan-tajikistan.html

очаги ящура в населенных пунктах, находящихся в непосредственной близости от российско-китайской государственной границы. Ученые неоднократно отмечали, что миграция диких животных (таких как дзерены), обитающих на территории России, Монголии и Китая, является одним из основных факторов распространения ящура в регионе [2, 6].

К ящуру восприимчивы многие дикие животные, в том числе лоси, олени, сайгаки, серны, зубры, буйволы, яки, джейраны, архары, лани, антилопы, муфлоны, косули, кабаны и т. д. В стадах сайгаков ящур появляется в то время, когда на путях их миграции находятся ящурные очаги среди сельскохозяйственных животных [3].

Сайгаки подвиды *Saiga tatarica tatarica* мигрируют по прикаспийской территории России, в Казахстане, Узбекистане и Туркмении. Монгольские сайгаки (*Saiga tatarica mongolica*) и дзерены ежегодно массово мигрируют в октябре-ноябре с территории Монголии в соседние регионы Китая, а в мае-июне на период окота возвращаются обратно. Трансграничная миграция повторяется в июле-августе. В настоящее время популяция сайгаков обитает в России (Северо-Западный Прикаспийский регион: Республика Калмыкия, Волгоградская и Астраханская области), Казахстане (Волго-Уральские пески, Устюрт и Бетпак-Дала) и Монголии (Шаргин Гоби и район Манхан сомона) [2].

Наибольшая вероятность возникновения вспышек ЧМЖ на территории России из-за миграции диких животных существует в пределах Сибирского и Дальневосточного федеральных округов, граничащих с неблагополучными по заболеванию странами (Китай, Монголия). Определенную значимость имеют вспышки ЧМЖ, произошедшие на юге Грузии в январе 2016 г. В случае повторного возникновения вспышек ЧМЖ в Грузии риск инфицирования животных в Северо-Кавказском и Южном федеральных округах РФ, где большая плотность восприимчивых животных, вновь станет высоким.

Исходя из эпизоотической ситуации по ООК в России в 2010–2017 гг. и эндемичности инфекции в Китае и северо-восточных аймаках Монголии, риску заноса и распространения болезни подвержены приграничные субъекты Российской Федерации: Забайкальский, Хабаровский и Приморский края, Республика Бурятия, а также Еврейская автономная и Амурская области [5].

IV. Механический путь передачи инфекции (автотранспорт, туристы, паломники, мигранты, насекомые)

В настоящее время на многих животноводческих фермах России работают выходцы из Китая, Центральной Азии и Закавказья, которые могут быть причиной заноса из неблагополучных территорий инфекционных агентов с живыми животными, животноводческими продуктами, а также механическим путем [10].

Промежуточными пассивными носителями вирусов ящура [4] и ООК [8] могут быть невосприимчивые животные – собаки, кошки, лошади и домашняя птица, распространяющие возбудителей механически за пределы эпизоотического очага. Второстепенная роль в распространении ящура принадлежит крысам и мышам, а также мухам, клещам и другим насекомым, являющимся механическими переносчиками вируса [4]. Клещи также могут быть переносчиками вирусов оспы овец и оспы коз [9].

Заразный узелковый дерматит относится к категории облигатно-трансмиссивных инфекций, так как передача возбудителя осуществляется в основном членистоногими переносчиками, главным образом комарами, мошками и мухами [7]. Обнаружены доказательства, свидетельствующие о возможности передачи ЗУД КРС клещами и птицами. Установлена возможность репродукции вируса нодулярного дерматита в клещах *Rhipicephalus appendiculatus* и *Amblyomma hebraeum*, а также трансвариальная передача в указанных видах и в клещах *Rhipicephalus decoloratus*. У данных насекомых перезимовка вне хозяина является частью их жизненного цикла, следовательно, они могут являться резервуаром вируса в межэпизоотический период [12, 19]. Инфицированные переносчики могут заражать свободные от заболевания популяции животных, перемещаясь на малые, средние и большие расстояния различными способами (с ветром, автотранспортом или птицами) [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно констатировать, что основными причинами трансграничного распространения везикулярных болезней являются: передвижение животных (законное/незаконное), продуктов животного происхождения, кормов, вакцин; миграция диких животных через границы соседних государств; пассивная механическая передача инфекции.

Так как Россия закупает из-за границы живых животных и продукты животного происхождения, существует определенная степень риска заноса возбудителей болезней с везикулярным синдромом на территорию Российской Федерации с указанным товаром. Наибольшую вероятность заноса возбудителей везикулярных болезней при легальном импорте в РФ представляет распространение болезней в следующих государствах: Китае, Турции, Индии, Монголии, Иране, Казахстане и др.

Правонарушения во внешней торговле представляют прямую угрозу для эпизоотической обстановки в России и экономической безопасности нашей страны. Факты незаконного перемещения через таможенную границу животноводческой продукции фиксируют ежегодно. Случаи нелегального импорта из Казахстана, Китая, Монголии, Кыргызстана можно отнести к особо опасным в отношении везикулярных болезней.

Источниками инфекций также могут служить дикие животные, особенно во время их передвижения через государственные границы. Передача вируса может быть осуществлена при контакте домашних и диких животных на пастбищах и водопоях. Неблагополучие по везикулярным болезням животных некоторых близлежащих к России государств создает постоянную угрозу заноса инфекций на территорию нашей страны по трем направлениям: северокавказскому, центральноазиатскому и дальневосточному.

Потенциальную угрозу заноса возбудителей болезней на территорию Российской Федерации также представляет импорт кормов для животных. Особенно настораживает устойчивость возбудителя сенекавирусной везикулярной инфекции, который может выживать в течение длительного времени в некоторых ингредиентах кормов. В настоящее время случаи сенекавирусной инфекции зарегистрированы в США, Бразилии, Канаде, Колумбии, Китае и Таиланде.

Учитывая представленные факты, следует заключить, что необходим усиленный надзор в области внешней и внутренней торговли Российской Федерации, причем наиболее пристальное внимание ветеринарной службы должно быть направлено на эпизоотическую ситуацию в сопредельных с Россией странах, а также в государствах, имеющих близкое географическое расположение. Для своевременного выявления возбудителей инфекционных болезней, циркулирующих среди мигрирующих популяций животных, необходимо проводить систематические диагностические исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ануфриева Т. А. Изучение физико-химических свойств вируса везикулярной болезни свиней, штамм Е-75: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владимир, 1983. – 21 с.
2. Жильцова М. В., Захаров В. М., Семакина В. П. Значимость систематического контроля циркуляции возбудителей особо опасных болезней в популяциях диких мигрирующих животных // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 2. – С. 34–38.
3. Заразные болезни диких животных / Всероссийский охотничий портал. – URL: <http://ihunter.ru/encyclopedia/books/priroda-i-okhota/zaraznye-bolezni-dikikh-zhivotnykh/> (дата обращения: 18.09.18).
4. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин [и др.]; под ред. А. А. Сидорчука. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.

5. К вопросу распространения вируса оспы овец и коз / К. О. Новикова, М. В. Инжуватова, Т. Е. Власова, Ю. Б. Васильева // Студенческий научный форум – 2016: материалы VIII Международной студенческой научной конференции. – URL: <https://www.scienceforum.ru/2016/1840/19493> (дата обращения: 15.09.18).
6. Лебедев Н. Возможной причиной заноса ящура стало трансграничное перемещение диких животных. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/25280.html>.
7. Особо опасные и экзотические инфекционные болезни. Краткий курс лекций / сост. В. А. Агольцов. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2014. – 42 с.
8. Оспа овец и коз / Ветеринарная служба Владимирской области. – URL: <https://vetvo.ru/ospa-ovec-i-koz.html>.
9. Оспа овец и коз: симптомы, лечение, вакцинация // Как вылечить овец и коз от оспы. – URL: <http://agronomwiki.ru/kak-vylechit-ovec-i-koz-ot-ospy.html>.
10. Рахманов А. М. Эпизоотология ящура в СССР и России и эффективность противоэпизоотических мероприятий // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2008. – Т. 6. – С. 43–64.
11. Роль диких жвачных животных в распространении ящура / А. В. Мищенко, В. А. Мищенко, В. М. Захаров [и др.] // Ветеринария. – 2012. – № 11. – С. 3–5.
12. Рябикина О. А., Диев В. И., Кукушкина М. С. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (обзор литературы) // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2015. – № 4 (28). – С. 45–52.
13. Сенекавирусная везикулярная болезнь свиней / А. В. Мищенко, В. П. Семакина, В. А. Мищенко, А. К. Караулов // Ветеринария. – 2017. – № 12. – С. 3–6.
14. Таможенная статистика внешней торговли. – URL: <http://stat.customs.ru/apex/f?p=201:2:1563280353489174::NO> (дата обращения: 10.09.18).
15. ФАО призывает к широкомасштабной вакцинации скота, чтобы сдержать нодулярный дерматит в Восточной Европе и на Балканах / Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО). – URL: <http://www.fao.org/news/story/ru/item/1039408/icode/> (дата обращения: 10.09.18).
16. Экспорт и импорт России по товарам и странам. – URL: <http://ru-stat.com/> (дата обращения: 18.09.18).
17. An economic assessment of foot and mouth disease in Japan / Y. Hayama, Y. Osada, D. Oushiki, T. Tsutsui // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2017. – Vol. 36 (1). – P. 207–215; DOI: 10.20506/rst.36.1.2622.
18. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan / P. C. Yang, R. M. Chu, W. B. Chung, H. T. Sung // Vet. Rec. – 1999. – Vol. 145 (25). – P. 731–734; DOI: 10.1136/vr.145.25.731.
19. Evidence of lumpy skin disease virus over-wintering by transstadial persistence in *Amblyomma hebraeum* and transovarial persistence in *Rhipicephalus decoloratus* ticks / J. C. Lubinga, E. S. Tuppurainen, J. A. Coetzer [et al.] // Exp. Appl. Acarol. – 2014. – Vol. 62 (1). – P. 77–90; DOI: 10.1007/s10493-013-9721-7.
20. Knight-Jones T. J., Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease – what are they, how big are they and where do they occur? // Prev. Vet. Med. – 2013. – Vol. 112 (3–4). – P. 161–173; DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.07.013.
21. Risk of introduction of lumpy skin disease in France by the import of vectors in animal trucks / C. Saegerman, S. Bertagnoli, G. Meyer [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13 (6):e0198506; DOI: 10.1371/journal.pone.0198506.
22. Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models / S. A. Dee, F. V. Bauer-mann, M. C. Niederwerder [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13 (3):e0194509; DOI: 10.1371/journal.pone.0194509.
23. The big imposter: Senecavirus A prompts frequent false alarms at Minnesota pork plant. – URL: <https://thepigsite.com/news/2018/07/the-big-imposter-senecavirus-a-prompts-frequent-false-alarms-at-minnesota-pork-plant-1> (дата обращения: 10.09.18).

Поступила 13.12.18

Принята в печать 09.01.19

RISK OF INTRODUCING HIGHLY DANGEROUS ANIMAL VESICULAR DISEASES INTO THE RUSSIAN FEDERATION

V. P. Semakina¹, T. P. Akimova², I. Yu. Solomatina³, A. K. Karaulov⁴

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

² Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: akimova@arriah.ru

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

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

SUMMARY

Animal vesicular diseases are rather widespread in the world. Transboundary vesicular diseases are mainly registered in African and Asian countries. They primarily include foot and mouth disease, sheep and goat pox, peste des petits ruminants, lumpy skin disease, swine vesicular disease, vesicular stomatitis, as well as relatively new Seneca Valley virus infection. The transboundary spread of vesicular diseases is mainly caused by legal and illegal movements of animals, animal products, feeds, live vaccines; migration of wild animals across the borders from neighboring countries and passive mechanical transmission of infection. The risk of vesicular disease agent introduction with legal import of live animals into the territory of the Russian Federation is minimal. Most likely, the causative agent can be introduced when livestock products are illegally imported from the following countries: China, Turkey, India, Mongolia, Iran, Kazakhstan, etc. Violations of foreign trade regulations pose a direct threat to the epidemic situation and economic security of Russia. There is a possibility of the introduction of vesicular agents with animal feed imports into the country since some viruses can potentially survive for a long time in some ingredients. Taking into account the fact that some neighboring countries are infected with vesicular diseases, the threat of infection introduction into Russia through migration of wild animals along the North Caucasian, Central Asian and Far Eastern routes still remains.

Key words: foot and mouth disease, sheep and goat pox, peste des petits ruminants, lumpy skin disease, porcine vesicular disease, vesicular stomatitis, Seneca Valley virus infection.

INTRODUCTION

"Vesicular diseases" is the common term for infections, manifested by the formation of vesicles, papules and pustules on different organs of an infected animal. The most dangerous, highly contagious and dramatically significant for economics, food security and international trade among them is foot and mouth disease (FMD). FMD outbreaks can cover vast territories, whole countries and even continents due to a wide range of susceptible wild and domestic animal species, the variety of virus shedding routes by infected animals and its high persistence in the environment and in animal products. This disease occurs in many countries and the possibility always exists that the virus is introduced into previously free areas, including free regions of the Russian Federation. That's why the state surveillance authorities impose restrictions on import of animals and animal products from FMD infected territories.

According to the World Organization for Animal Health (OIE) the most significant diseases to be differentiated

from FMD include vesicular stomatitis, swine vesicular disease, sheep and goat pox and lumpy skin disease. Pursuant to the International classification of animal infectious diseases these diseases are referred to as transboundary ones, i. e. "they have the potential for very rapid spread, irrespective of national borders, causing serious socio-economic and possibly public health consequences and may also have a significant detrimental effect on international trade in animals and animal products".

MATERIALS AND METHODS

OIE data on outbreaks of highly dangerous vesicular diseases in the world were used for the risk assessment. Additional information was searched using Federal Customs Service database, Veterinary Service reports and mass-media publications. The qualitative assessment of animal vesicular disease introduction risk to the Russian Federation is given in the paper.

Pursuant to the OIE definition (Terrestrial Animal Health Code 2017), risk assessment means the evaluation of the likelihood and the biological and economic consequences of entry, establishment and spread of a hazard within the territory of an importing country.

RESULTS AND DISCUSSION

Vesicular diseases

Vesicular diseases primarily include FMD, sheep and goat pox (SGP), peste des petits ruminants (PPR), lumpy skin disease (LSD), swine vesicular disease (SWD), vesicular stomatitis (VS) and Seneca Valley virus infection (SVVI).

According to Article 1.4.6 of the Terrestrial Animal Health Code the Russian Federation is historically free from *swine vesicular disease* and *vesicular stomatitis*, because VS has never been registered in the Russian Federation and SVD cases have not been reported since 1975 [1]. In 2015 VS and SVD were excluded from the OIE list. This was based on the absence of natural transmission of the viruses to humans and low morbidity and mortality in domestic and wild animals. SWD single cases are reported in the world (during the last decade only cases in Italy have been reported). Sporadic VS cases are registered in America.

Russia's territory is historically free from *peste des petits ruminants*, but during the last years the number of epidemiological forecasts of possible infection introduction to our country has been increasing. This is explained by

proximity of PPR infected Asian countries and close trade and economic relations with them. PPR transboundary spread can be caused also by illegal movements of infected animals and animal products, as well as migration of wild animals across the borders of neighboring countries. It means the closest attention of the RF Veterinary Service is focused on the epidemic situation in the neighboring countries like China, Mongolia, Kazakhstan and Georgia as well in geographically close countries like Turkey, Bulgaria, Afghanistan, Iran, etc. PPR global situation shows that the greatest risk of PPR occurrence exists in the North Caucasian, Southern and Volga Federal Districts, characterized by high density of susceptible animals.

Sheep and goat pox is spread in African and European countries; the disease is reported in the Russian Federation from time to time. The disease has a detrimental effect on economics, hampers the development of livestock production, decreases the performance and impedes the trade in animals and animal products. China, Mongolia, Kazakhstan, which report sheep and goat pox from year to year, border the Russian Federation thus creating the threat of the disease further spread in our country.

From 2016 to 2018 49 *lumpy skin disease* infected countries were registered: 33 African, 7 Asian and 9 European. The disease is not registered in Americas, Australia and Oceania. Since 2013 LSD has been rapidly spreading in the Middle East and Central Asia. LSD was firstly reported in the Russian Federation in July 2015.

The risk of LSD further spread in the Russian regions is high, especially in North Caucasian, Southern, Central and Volga Federal Districts. It may lead to serious social and economic consequences for domestic livestock production.

There is a great risk of LSD introduction to Eastern Europe and Balkan free countries. In this light, in order to prevent and control the infection spread, the UN Food and Agricultural Organization (FAO) calls for mass cattle vaccination, especially in the run-up to the biting insect season, when infection rates are the highest [15].

Among all vesicular diseases the biggest threat for Russia is posed by *foot and mouth disease*, which tends to spread in vast territories and is of epidemic and pandemic nature. FMD is the disease that should be the first one to be excluded in case of vesicular clinical signs. FMD virus can be introduced from endemic regions even to economically developed countries. Herewith FMD can cause great economic losses to the national livestock production.

A good example here is an FMD outbreak in Great Britain in 2001, where the disease was reported in 13 counties; 2,026 FMD outbreaks were registered and more than 6 million animals were killed. Total economic losses caused by the outbreak estimated from 5.8 to 8.6 billion pounds, equivalent to about 10.7–14 billion US dollars [20]. Outbreak in Taiwan in 1997 is an ample proof of FMD significance as of a highly dangerous infection, able to spread rapidly over vast territories. The economic losses were estimated at 379 million US dollars, because more than 4 million pigs were killed, which represented 40% of national pig population. The economic impact from the pork export ban and loss of profits pertaining to tourism was estimated at 1.6 billion US dollars [18]. A large scale FMD outbreak in Japan in 2010 caused a serious damage for livestock production and related industries. Livestock production direct costs amounted to 51.2 billion yens; indirect losses of related industries totaled 25.5 billion yens; costs

of disease control measures were equal to 8.2 billion yens. Total economic impact of FMD epidemic was estimated at almost 85 billion yens or 934 million US dollars at the 2010 exchange rate [17].

Annual economic damage caused by FMD, including direct production losses and vaccination costs, amounts to 6.5–21 billion US dollars only in endemic countries. Besides, FMD outbreaks in FMD free countries and zones result in losses equal to 1.5 billion US dollars a year [20].

In the RSFSR territory FMD was eradicated in 1989. The eradication measures were based on preventive vaccination, stamping out policy in the outbreak area and ring vaccination. The disease reoccurred for the first time after eradication in Russia in 1993. Since that time outbreaks have been registered predominantly along the southern borders of the country. Taking into account the fact, that several neighboring countries and regions (primarily China, Mongolia, Middle East and Central Asia countries) remain FMD infected, there is still a threat of virus introduction into Russia. In order to prevent it the zone of constant animal vaccination with FMD targeted surveillance is maintained in the Russian regions, bordering FMD infected countries.

More recently (in 2007) the information about a new virus, causing a vesicular disease in animals, *Seneca Valley virus infection*, became available. Since the end of 2014 the number of SVVI outbreaks in pigs of different commercial categories has been increasing. Within three years (from November 2014 to November 2017) SVVI cases were reported in six countries: USA, Brazil, Canada, Columbia, China and Thailand. SVVI is difficult to be distinguished from FMD and other vesicular diseases in adult pigs and fattening piglets. Besides, the Seneca Valley virus is extremely stable in the environment and can survive under different conditions [23].

A high risk of SVV introduction to the Russian Federation with infected breeding pigs, slaughter products, contaminated fetal serum, trypsin and cell cultures, as well as with virus vaccines was identified [13].

Risk assessment

Domestic and global experience suggests the following most common routes and causes of most vesicular disease virus introduction to any free zones (countries):

- I. Import of live animals and animal products.
- II. Import of improperly produced feeds, vaccines and veterinary medicines.
- III. Migration of wild animals.
- IV. Mechanical route (vehicles, tourists, pilgrims, migrants, insects).

I. Import of live animals and animal products

As Russia purchases live animals and animal products from abroad, there is a risk of these agents' introduction both legally (if imported from trade partner countries) and illegally (for example illegal movement of animals in the bordering areas). Agents can also be transmitted during migration of wild animals, by contacts between domestic and wild animals at pastures and watering places. Moreover, as Russia has the longest land border, it is under the constant threat of introduction of different animal transboundary disease agents. The evidence of this is the introduction of LSD and ASF viruses to Russia from Caucasian countries.

There is a certain risk of introducing disease agents to the countries with imported susceptible animals, meat, hides, casings, bones, horns, hooves and hair.

Table 1
Import of live animals to Russia [16]

Country	Import share, %	Import share by species					
		horses, donkeys, mules	cattle	pigs	sheep, goats	poultry	others
Netherlands	27.0	0.4	68.0	–	0.1	28.2	3.3
Germany	21.1	0.7	85.8	–	0.2	13.0	0.3
Australia	15.7	–	77.2	–	22.8	–	–
Hungary	8.8	0.4	84.1	–	0	15.5	–
Denmark	7.9	0.1	99.9	–	–	–	0
Canada	3.7	0.9	1.9	97.1	–	–	0
France	3.3	3.1	14.3	–	–	69.1	13.6
USA	2.2	33.9	58.9	–	1.1	0.3	5.9
Republic of Belarus	1.5	3.0	49.3	21.8	0.1	20.6	5.2
Austria	1.3	0	72.6	–	6.8	20.6	0
Great Britain	1.2	9.4	–	–	–	61.7	29.0
Ireland	0.8	51.8	48.2	–	–	–	–
Uzbekistan	0.7	–	–	–	–	–	100.0
Ukraine	0.7	1.1	28.1	–	–	–	70.8
Belgium	0.6	2.9	–	–	–	–	97.1
Israel	0.6	0.7	–	–	–	–	99.3
Czech Republic	0.5	0.5	36.2	–	–	44.4	18.9
Finland	0.4	0.8	99.2	–	–	–	0
Estonia	0.4	0.3	99.7	–	–	–	–
Slovakia	0.4	–	10.4	–	–	–	89.6

The registration of FMD, LSD, SGP, PPR outbreaks in 2015–2018 in the countries, closely located to the Russian Federation and/or having agricultural trade relationships with it (Georgia, Mongolia, China, etc.) is a matter of some concern.

1. Legal import of live animals

The risk of introducing vesicular disease agents to the Russian Federation with legal import of live animals is minimal, because the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance controls the global epidemic situation and in case of outbreaks in trade partner countries, it imposes temporary restrictions on import of goods, posing risk.

In 2017 – May, 2018 top twenty countries, exporting the largest number of live animals to Russia, included European countries, Canada, USA and Uzbekistan (Table 1).

All these countries are free from FMD, sheep and goat pox, peste des petits ruminants and lumpy skin disease. But it should be noted that cases of Seneca Valley virus infection are reported in Canada and the USA. Besides, Kazakhstan was on the list of live cattle importers to Russia in 2017–2018, though LSD case was registered there in 2016.

2. Legal import of animal products

Table 2 shows countries, which as of 2018 export animal products to the RF and are infected with vesicular diseases.

A high import share of animal products conventionally accounts for butter, cheese, curd and beef, which could be factors in spreading the infection, if animal health rules are not met.

Thus, it can be presumed, that in case of legal import the highest risk of introducing the agents of vesicular diseases to the RF is posed by the countries, where these agents are present, i.e. by China, Turkey, India, Mongolia, Iran, Kazakhstan, etc.

3. Illegal import of live animals and animal products

Illegal movements of animal products and live animals across the customs border are detected every year. Illegal imports from Kazakhstan, China, Mongolia and Kyrgyzstan jeopardize the epidemic situation in terms of vesicular diseases. Table 3 summarizes data on attempts to import potentially dangerous animal products and live animals across the RF state border in 2018 according to mass media.

Judging by the facts published by the Russian mass media, the number of international and Russian law vio-

lations in this area is not diminishing. Infringements in foreign trade pose direct threat to epidemic situation and economic security of Russia.

II. Import of feeds, live vaccines and veterinary medicines

Import of feeds for animals to the Russian Federation is also a potential threat of disease agent introduction. To be imported into the customs territory of the Eurasian Economic Union feeds and feed additives of animal origin shall be free from bovine spongiform encephalopathy and scrapie, African swine fever, horse sickness, rinderpest, classical swine fever, sheep and goat pox, psittacosis, anthrax, horse influenza, avian influenza and Newcastle disease. But the US researchers discovered that some viruses, including SVV, can potentially survive for a long time in some feed ingredients. Senecavirus A proved to be a rather resilient virus, which could persist in all tested feed components. Thus it was proved that some feed ingredients can pose risks, as they can transmit viruses between farms and different countries [22].

Vaccines, as well as live vaccines, are imported to Russia; and in case of improper manufacture, live vaccines can pose a potential threat of the disease agent introduction. The potential contamination of trypsin, serum and vaccine components, imported to our country as raw materials for domestic production, should be also taken into account.

Though live vaccines represent a small percentage among all authorized veterinary products in Russia, they

can become a cause of diseases in animals, including vesicular diseases.

III. Migration of wild animals

Wild animals can become the source of infection, especially if they move across the state borders. Wild ruminants can be infected from domestic ones and, in turn, serve as a source of infectious disease agents for farmed animals. The agent circulation in wild fauna creates a risk of food producing animal infection, particularly at common pastures and watering places. If nomadic husbandry is practiced, the migration routes of wild animals can cross agricultural pastures and green fodder areas [11].

Taking into account the fact that some Russia's neighboring countries are infected with vesicular diseases, the threat of infection introduction to Russia along the following three routes remains: North Caucasian, Central Asian and Far Eastern routes. Practically every year the Russian Veterinary Service reports FMD outbreaks in the settlements, located in the proximity to the Russian-Chinese border. Scientists have repeatedly pointed out that the migration of wild animals (Mongolian gazelles, for example), inhabiting Russia, Mongolia and China, are one of the major factors, facilitating FMD spread [2, 6].

Many wild animals are susceptible to FMD, including elks, deer, saiga antelopes, chamois, bison, buffaloes, yaks, goitered gazelles, mouflons, roes, wild boar, etc. FMD occurs in saiga antelope populations when FMD outbreaks are present along their migration routes [3].

Table 2
Import of animal products to Russia in 2018 [14]

Country	Imported products	Disease			
		FMD	LSD	SGP	PPR
Armenia	milk, cream, butter, cheese, curd, untreated bovine hides		+		
Bulgaria	animal hair and wool		+	+	+
China	meat and offal, bristles, animal products, animal hair and wool	+		+	+
Columbia	beef, offal of cattle, pigs, sheep and goats, butter	+			
Egypt	cheese and curd	+	+	+	+
Greece	non-edible animal products		+		
India	frozen beef	+			+
Iran	milk, cream, butter, cheese and curd	+	+	+	+
South Korea	animal products, tanned leather from animal hides	+			
Kazakhstan	beef, offal of cattle, milk, cream, butter, cheese and curd, untreated bovine hides, wool		+		
Morocco	cheese and curd			+	
Mongolia	frozen beef, animal hair and wool	+		+	+
Nepal	tanned leather from bovine animal hides	+		+	+
Tunisia	cheese and curd	+		+	+
Turkey	cheese and curd, tanned leather from sheep and lamb hides, wool	+	+	+	+
SAR	animal products	+	+		

+ means infected (pursuant to the OIE Terrestrial Animal Health Code; terms for disease freedom status recovery: for FMD – 12 months, for PPR – 24 months, for LSD and SGP – 36 months of no cases reported).

Table 3
Illegal imports of live animals and animal products to Russia

Country	Product	Reference
Kazakhstan	canned fish and meat	http://www.vzsar.ru/news/2018/07/06/konservy-bez-dokumentov-razvernili-na-granice-v-ozinkah.html
Kazakhstan	small ruminants	http://www.fsvps.ru/fsvps/news/27293.html
Kazakhstan	cheese	https://fn-volga.ru/news/view/id/86855
Kazakhstan	dairy products	http://www.fsvps.ru/fsvps/news/26991.html
Kazakhstan, Kyrgyzstan	canned meat, poultry, beef	https://fn-volga.ru/news/view/id/86855
Kyrgyzstan	fermented dairy products	https://www.alt.kp.ru/online/news/3188407/
China	meat	https://www.hab.kp.ru/online/news/3057201/
China	sausages	http://www.rshn-khv-eao.ru/novosti/46-pogranichnyj-veterinarnyj-kontrol/1412-zapreshchennye-produkty-zaderzhali-na-granice
Mongolia	boiled mutton	https://www.baikal-daily.ru/news/16/322825/
Mongolia	meat products	https://www.inpol.ru/88349-v-buryatii-zaderzhali-grazhdanina-kotoryy-pytalsya-provezti-iz-mongolii-zapreshchennoe-myaso/
Mongolia	beef	https://www.baikal-daily.ru/news/16/313221/
Uzbekistan	meat and dairy products	https://www.vrn.kp.ru/online/news/3186597/
Uzbekistan Tajikistan	milk	https://ru.sputnik-tj.com/russia/20180728/1026312797/cplyata-vnukovo-yashchur-uzbekistan-tajikistan.html

Subspecies *Saiga tatarica tatarica* of saiga antelopes migrate in Russia's Caspian area, in Kazakhstan, Uzbekistan and Turkmenistan. Mongolian saiga antelopes (*Saiga tatarica mongolica*) and Mongolian gazelles migrate massively in October-November from Mongolian territory to the neighboring Chinese regions and in May-June, during lambing time, they migrate back. Transboundary migration reoccurs in July-August. Currently saiga antelope habitat covers Russia (North West Caspian region: Republic of Kalmykia, Volgograd and Astrakhan Oblasts), Kazakhstan (Volga-Ural Sands, Ustyurt and Betpak-Dala) and Mongolia (Sharga and Mankhan Nature Reserves) [2].

PPR outbreaks due to migration of wild animals are most likely to occur in Russia's Siberian and Far Eastern Federal Districts, neighboring infected countries (China, Mongolia). PPR outbreaks in southern Georgia in 2016 are also of certain significance, in case PPR reoccurs in Georgia, risk of animal infection in North Caucasian and Southern Federal Districts, where animal population is dense, will increase again.

Given the SGP situation in Russia in 2010–2017 and infection endemicity in China and north-eastern aimags of Mongolia, the following border administrative subjects of the Russian Federation are under the risk of infection introduction and spread: Zabaikalsky, Khabarovsk and Primorsky Krai, Republic of Buryatia, Jewish Autonomous and Amur Oblasts [5].

IV. Mechanical route of infection transmission (vehicles, tourists, pilgrims, migrants, insects)

Currently many livestock farms employ nationals from China, Central Asia and Caucasus, who can bring the infectious agents from infected areas with live animals, animal products, as well as by mechanical route [10].

Intermediate passive carriers of FMD [4] and SGP [8] viruses can include insusceptible animals, like dogs, cats, horses and poultry, transmitting the agents mechanically outside the outbreak area. Secondary role in FMD spread is played by rats and mice, as well as by flies, ticks and other insects, being mechanical virus vectors [4]. Ticks also can transmit sheep and goat pox viruses [9].

Lumpy skin disease belongs to vector-borne infections, as the agent is transmitted primarily by arthropod vectors, usually mosquitoes, midges and flies [7]. There is an evidence supporting LSD transmission by ticks and birds. It was established that lumpy skin disease virus can reproduce in *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum* ticks, as well as transovarial transmission in these species and in *Rhipicephalus decoloratus* ticks is also possible. For these insects, wintering outside the host is a part of their life cycle, therefore they can serve as virus reservoirs during the inter-epidemic period [12, 19]. Infected vectors can infect disease-free animal populations, travelling short, medium and long distances by different means (by wind, vehicles or birds) [21].

CONCLUSION

Thus it may be stated that basic causes of vesicular disease transboundary spread include: movements of animals (legal/illegal), animal products, feeds and vaccines; migration of wild animals across the borders from neighboring countries and passive mechanical transmission.

As Russia purchases live animals and animal products from abroad, there is a risk of vesicular disease agents' introduction to the Russian Federation with such products. The highest risk of vesicular disease introduction with le-

gal imports is presented by the following countries, where such diseases are present: China, Turkey, India, Mongolia, Iran, Kazakhstan, etc.

Infringements in foreign trade also jeopardize the epidemic situation and economic security in Russia. Illegal movements of animal products across the customs border are detected every year. Illegal imports from Kazakhstan, China, Mongolia, Kyrgyzstan can be referred to as highly dangerous in terms of vesicular diseases.

Wild animals can become the source of infection, especially if they move across the state borders. Viruses can be transmitted by contacts between wild and domestic animals at common pastures and watering places. The fact that some Russia's neighboring countries are infected with vesicular diseases creates a constant threat of infection introduction to Russia along the following three routes: North Caucasian, Central Asian and Far Eastern routes.

Import of feeds for animals to the Russian Federation is also a potential threat of disease agent introduction. The stability of Seneca Valley virus, surviving for long periods in certain feed ingredients, is especially alarming. Up to date Seneca Valley virus infection cases have been registered in the USA, Brazil, Canada, Columbia, China and Thailand.

Given the presented facts, it should be concluded that the enhanced surveillance in foreign and domestic trade is needed with special attention paid by the state veterinary service to the epidemic situation in Russia's neighboring and closely located countries. In order to timely detect infectious disease agents, circulating among migrating animal populations, systematic diagnostic tests are required.

Conflict of interests. The authors claim no conflict of interests.

REFERENCES

1. Anufrieva T. A. Studies on the physical and chemical properties of porcine vesicular disease, E-75 strain [Izuchenie fiziko-himicheskikh svoystv virusa vezikulyarnoy bolezni svinej, shtamm E-75]: author's abstract Candidate of Science (Biology). Vladimir, 1983 (in Russian).
2. Zhiltzova M. V., Zakharov V. M., Semakina V. P. Significance of systematic control of the circulation of pathogens of especially dangerous diseases in populations of wild migratory animals [Znachimost' sistematicheskogo kontrolya cirkulyacii vozbuditelej osobo opasnyh boleznej v populyacijah dikih migriruyushchih zhivotnyh]. *Veterinary Science Today*. 2017; 2: 34–38 (in Russian).
3. Contagious wild animal diseases [Zaraznye bolezni dikih zhivotnyh]. *All-Russian Hunting Portal*. URL: <http://ihunter.ru/encyclopedia/books/priroda-i-okhota/zaraznye-bolezni-dikikh-zhivotnykh/> (access date: 18.09.18) (in Russian).
4. Infectious animal diseases [Infekcionnye bolezni zhivotnyh]. B. F. Bessarabov, A. A. Vashutin, E. S. Voronin [et al.]; ed. by A. A. Sidorchuk. M.: Kolos, 2007 (in Russian).
5. On spread of sheep and goat pox [K voprosu rasprostraneniya virusa ospy ovec i koz]. K. O. Novikova, M. V. Inzhuvatova, T. E. Vlasova, Tu. B. Vasilyeva. *Student Research Forum–2016: Proceedings of VIII International Student Research Conference*. URL: <https://www.scienceforum.ru/2016/1840/19493> (access date: 15.09.18) (in Russian).
6. Lebedev N. Transboundary movement of wild animals is a possible cause for the introduction of foot and mouth disease [Vozmozhnoj prichinoj zanosy yashchura stalo transgranichnoe peremeshchenie dikih zhivotnyh]. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/news/25280.html> (in Russian).
7. Highly dangerous and exotic infectious diseases. Short course lectures [Osobo opasnye i ehkzoticheskie infekcionnye

bolezni. Kratkij kurs lekciij]. Compiled by V. A. Agoltzov. Saratov: Saratov State Agrarian University, 2014 (in Russian).

8. Sheep and goat pox [Ospa ovec i koz]. *Vladimir Oblast Veterinary Service*. URL: <https://vetvo.ru/ospa-ovec-i-koz.html> (in Russian).

9. Sheep and goat pox: symptoms, treatment, vaccination [Ospa ovec i koz: simptomy, lechenie, vakcinaciya]. *How to treat sheep and goat pox*. URL: <http://agronomwiki.ru/kak-vylechit-ovec-i-koz-ot-ospy.html> (in Russian).

10. Rakhmanov A. M. FMD epizootology in the USSR and Russia and effectiveness of anti-epidemic measures [Epizootologiya yashchura v SSSR i Rossii i ehffektivnost' protivoehpizooticheskikh meropriyatij]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2008; 6: 43–64 (in Russian).

11. Role of wild ruminants in FMD spread [Rol' dikih zhivotnyh zhivotnyh v rasprostraneni yashchura]. A. V. Mischenko, V. A. Mischenko, V. M. Zakharov [et al.]. *Veterinariya*. 2012; 11: 3–5 (in Russian).

12. Ryabikina O. A., Diev V. I., Kukushkina M. S. Lumpy skin disease (literature review) [Nodulyarnyj dermatit krupnogo rogatogo skota (obzor literatury)]. *Actual Questions of Veterinary Biology*. 2015; 4 (28): 45–52 (in Russian).

13. Senecavirus porcine vesicular disease [Senekavirusnaya vezikulyarnaya bolezni' svinej]. A. V. Mischenko, V. P. Semakina, V. A. Mischenko, A. K. Karaulov. *Veterinariya*. 2017; 12: 3–6 (in Russian).

14. Customs statistics of foreign trade [Tamozhennaya statistika vneshnej trgovli]. URL: <http://stat.customs.ru/apex/f?p=201:2:1563280353489174::NO> (access date: 10.09.18) (in Russian).

15. FAO calls for large-scale livestock vaccination to contain lumpy skin disease in Eastern Europe and the Balkans [FAO prizyvaet k shirokomasshtabnoj vakcinacii skota, chtoby sderzhat' nodulyarnyj dermatit v Vostochnoj Evrope i na Balkanah]. *Food and Agricultural Organization of UN (FAO)*. URL: <http://www.fao.org/news/story/ru/item/1039408/icode/> (access date: 10.09.18) (in Russian).

16. Russia's export and import by commodities and countries [Eksport i import Rossii po tovaram i stranam]. URL: <http://ru-stat.com/> (access date: 18.09.18) (in Russian).

17. An economic assessment of foot and mouth disease in Japan. Y. Hayama, Y. Osada, D. Oushiki, T. Tsutsui. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2017; 36 (1): 207–215; DOI: 10.20506/rst.36.1.2622.

18. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. P. C. Yang, R. M. Chu, W. B. Chung, H. T. Sung. *Vet. Rec.* 1999; 145 (25): 731–734; DOI: 10.1136/vr.145.25.731.

19. Evidence of lumpy skin disease virus over-wintering by transstadial persistence in *Amblyomma hebraeum* and transovarial persistence in *Rhipicephalus decoloratus* ticks. J. C. Lubbinga, E. S. Tuppurainen, J. A. Coetzer [et al.]. *Exp. Appl. Acarol.* 2014; 62 (1): 77–90; DOI: 10.1007/s10493-013-9721-7.

20. Knight-Jones T. J., Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease – what are they, how big are they and where do they occur? *Prev. Vet. Med.* 2013; 112 (3–4): 161–173; DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.07.013.

21. Risk of introduction of lumpy skin disease in France by the import of vectors in animal trucks. C. Saegerman, S. Bertagnoli, G. Meyer [et al.]. *PLoS ONE*. 2018; 13 (6): e0198506; DOI: 10.1371/journal.pone.0198506.

22. Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. S. A. Dee, F. V. Bauermann, M. C. Niederwerder [et al.]. *PLoS ONE*. 2018; 13 (3): e0194509; DOI: 10.1371/journal.pone.0194509.

23. The big imposter: Senecavirus A prompts frequent false alarms at Minnesota pork plant. URL: <https://thepigsite.com/news/2018/07/the-big-imposter-senecavirus-a-prompts-frequent-false-alarms-at-minnesota-pork-plant-1> (access date: 10.09.18).

Submitted on 13.12.18
Approved for publication on 09.01.19

ЭНТОМОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭПИЗООТОЛОГИИ ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР)

Я. Е. Пестова¹, А. В. Кононов², А. В. Спрыгин³

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

² Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononov@arriah.ru

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

РЕЗЮМЕ

Заразный узелковый дерматит представляет серьезную угрозу скотоводству во всем мире, включая Российскую Федерацию, где первая вспышка зарегистрирована в 2015 г. С момента первого появления заболевание продолжает распространяться по территории нашей страны, при этом механизмы трансмиссии вируса до сих пор не изучены. Наиболее вероятным механизмом передачи вируса на короткие расстояния считается передача через укусы насекомых. В качестве потенциальных векторов в настоящее время рассматриваются такие виды членистоногих, как мухи-жигалки *Stomoxys calcitrans*, комары *Aedes aegypti*, клещи *Amblyomma hebraeum* и *Rhipicephalus appendiculatus*. Вирусная ДНК также обнаружена на поверхности экзоскелета домашних мух *Musca domestica*. В доступной литературе описаны результаты многих исследований по изучению роли членистоногих в распространении вируса заразного узелкового дерматита, однако представленные данные противоречивы и не отвечают однозначно на вопрос о степени значимости изучаемых потенциальных векторов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота при развитии эпизоотического процесса в полевых условиях. В этих работах изучены возможности слепней, мух и клещей выступать в качестве механического переносчика. На сегодняшний день не существует однозначной точки зрения в отношении достоверного вектора заразного узелкового дерматита. В данной работе проведен обзор энтомологических научно-исследовательских работ, целью которых являлось изучение возможной трансмиссии вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота через членистоногих.

Ключевые слова: заразный узелковый дерматит, насекомые, трансмиссия.

UDC 619:616.98:578.821.2:636.22/.28

ENTOMOLOGICAL ASPECTS OF LUMPY SKIN DISEASE EPIZOOTOLOGY (REVIEW)

Ya. E. Pestova¹, A. V. Kononov², A. V. Sprygin³

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

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

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

SUMMARY

Lumpy skin disease (LSD) is a serious threat to the global cattle farming, including that in the Russian Federation where the first outbreak was reported in 2015. Since the disease occurred for the first time, it has continued to spread in this country; however, virus transmission mechanisms have not yet been studied. Transmission through insect bites is considered to be the most likely mechanism of virus short-range transmission. At present, such arthropod species as stable fly (*Stomoxys calcitrans*), *Aedes aegypti* mosquitoes, as well as *Amblyomma hebraeum* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks are regarded as potential vectors. Viral DNA has also been detected on the exoskeletons of house flies (*Musca domestica*). The available literature describes the results of many studies on the role of arthropods in LSD virus spread, but the data presented are inconsistent and do not provide an unambiguous answer concerning the level of significance of potential LSD virus vectors in the progression of the field epizootic. These papers investigate the ability of gadflies, flies and ticks to act as mechanical vectors. Currently, there is no unequivocal viewpoint with respect to the proved LSD vector. This paper reviews the entomological papers aimed at studying possible LSD virus transmission by arthropods.

Key words: lumpy skin disease, insects, transmission.

Заразный узелковый дерматит (нодулярный дерматит, ЗУД) – заболевание крупного рогатого скота (КРС) и буйволов, характеризующееся повышением температуры тела, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (бугорков), поражением глаз и слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов. Болезнь характеризуется высокой заболеваемостью и низкой смертностью [9].

Возбудителем ЗУД является ДНК-содержащий оболочечный вирус семейства *Poxviridae* рода *Capripoxvirus*, к которому относятся также вирусы оспы овец (SPPV – sheeppox virus) и оспы коз (GTPV – goatpox virus) [12]. Вирусный геном представлен двухцепочечной ДНК [15].

ЗУД КРС относят к особо опасным болезням животных, способным вызывать эпизоотии и наносить значительный экономический ущерб. Он включен в список болезней, подлежащих обязательному уведомлению (нотификации) МЭБ. В 2018 г. вспышки инфекции зарегистрированы в Албании, Болгарии, Греции, Сербии, Турции, РФ и других странах (по данным МЭБ).

Распространение вируса ЗУД за пределы эпизоотического очага возможно двумя путями. Во-первых, с зараженными животными и особями, находящимися в инкубационном периоде, – активными продуцентами возбудителя в инаппарантной форме. Считается, что КРС могут быть вирусоносителями в латентной форме без формирования поражений на коже. В этом случае субклинически инфицированные животные, возможно, не только выполняют функцию активного источника инфекции, но и служат важным фактором распространения вируса на большие расстояния, что чаще всего связано с перегоном скота или нелегальной транспортировкой на автомобилях. Важно отметить, что ЗУД является причиной крупных экономических потерь, таких как резкое снижение молочной продуктивности, качества молока и кожевенного сырья, потеря живой массы, аборт, бесплодие у быков и ухудшение фертильности у коров, а также вследствие ограничений, накладываемых на торговлю животноводческой продукцией [25].

Во-вторых, в настоящее время предполагается, что важную роль в распространении ЗУД КРС играют насекомые и клещи [21, 22]. Установлено, что возможными факторами риска являются также теплый влажный климат, общий выпас/водопой и ввод в стадо новых животных [1, 19].

Эпизоотологические данные свидетельствуют о связи между вспышками ЗУД и наличием в теплое время года большого количества популяций кровососущих членистоногих, которые выступают в качестве механических переносчиков [17]. Вспышки ЗУД возникают в основном летом, когда на активность насекомых влияют благоприятные условия окружающей среды, особенно большое количество осадков и высокая температура [6, 10]. К сожалению, в доступной литературе нет информации о том, как вирус сохраняется в межсезонье, когда активность переносчиков минимальна или полностью отсутствует.

Передача возбудителя ЗУД в основном осуществляется кровососущими членистоногими. Считается, что прямой или опосредованный контакты между инфицированными и восприимчивыми животными не играют значимой роли во время эпизоотий, по крайней мере, на ранних стадиях заболевания. Данная точка зрения

была предложена V. M. Carn и соавт., которые показали, что восприимчивые животные, находившиеся в тесном контакте с зараженными, остались здоровыми в течение одного месяца эксперимента [5].

Большую значимость имеет непрямой способ передачи вируса ЗУД. Экспериментальное инфицирование животных путем внутрикожной инъекции не приводило к генерализованной инфекции по сравнению с внутривенной инокуляцией [5]. Математическая модель, созданная в рамках исследования вспышки ЗУД на молочной ферме в Эйин-Цуриме (Израиль, 2006 г.), подтверждает эти результаты, демонстрируя важность не прямой передачи вируса (вероятно, через вектор) [20]. Гипотеза о том, что передача ЗУД неэффективна без участия кровососущих членистоногих, согласуется с экспериментальными результатами К. Е. Weiss, который сообщал о невозможности распространения вируса между зараженными и здоровыми животными без механических переносчиков [33]. Это также соответствует данным работ, где сообщалось, что вспышки ЗУД продолжались даже при незначительном количестве популяций кровососущих мух, причем число новых вспышек уменьшилось с началом сухого сезона и при снижении популяции кровососущих насекомых [4].

Необходимо отметить, что для эффективного контроля над распространением заболевания нужно изучить роль различных видов членистоногих при передаче вируса ЗУД, причем в различных географических регионах.

Обилие насекомых во время вспышки является первым предварительным условием для того, чтобы их считать вектором [24]. Поэтому определение сезонной динамики популяции потенциальных векторов, помимо компетентности самого вектора (т. е. способности выступать в роли переносчика), имеет большое значение для правильного понимания эпизоотологических особенностей трансмиссивных заболеваний. Возможность вектора передать вирус также определяется вероятностью его укуса, количеством укусов, плотностью популяции насекомого и восприимчивостью хозяина [17].

Ранее клинические признаки ЗУД принимали за проявление аллергической реакции на укусы насекомых. Это предположение было основано на увеличении количества вспышек заболевания после дождей, когда количество укусов было максимальным [32].

Есть данные, что холодная погода способствует резкому сокращению передачи вируса, случаи заболевания животных ЗУД регистрируются в значительно меньшем количестве или вовсе не регистрируются. Это напрямую связано с сокращением активности насекомых и подтверждает роль последних в трансмиссии заболевания [7]. Большая часть эпизоотологических данных из Африки свидетельствует о том, что направление вектора распространения вируса из очагов, несмотря на строгий контроль за заболеванием, связано с движением насекомых [16]. Анализ вспышек ЗУД в Израиле также подтверждает вывод о том, что клинические признаки у животных появляются вслед за воздушным перемещением инфицированных насекомых. Передача вируса происходила на расстоянии от 70 до 300 км. По метеорологическим данным, были зарегистрированы потоки ветров, способные переносить инфицированных насекомых из дельты Нила на территорию страны [23].

Экспериментальные или эпизоотологические доказательства способности поксвирусов поддерживать их репликацию в организме насекомого в литературе не представлены, что, возможно, связано с размером вириона. Однако существует достаточно работ, описывающих механическую передачу поксвирусов, например, при миксоматозе [13], при этом вирус экспериментально переносился москитами.

Результаты эпизоотологического обследования очагов ЗУД, возникших в Египте, послужили основанием для предположения о том, что на территорию, где произошла вспышка заболевания, вирус мог быть занесен механически посредством контаминированного переносчика – мух-жигалок (*Stomoxys calcitrans*). Расстояние между активным и вновь возникшим очагами было более 85 км [27]. Известно, что в естественных условиях дальность полета большинства кровососущих насекомых редко превышает 100 м [2], тогда как ветра могут существенно увеличить дальность лёта. Однако это предположение не подтверждено экспериментальными данными.

Характерная особенность мух-жигалок – прерывистое питание от 3 до 5 раз для полного насыщения. Кровососание может быть прервано раньше в результате защитного поведения животного в ответ на болезненный укус насекомого. Для продолжения питания муха может использовать того же хозяина либо ищет нового. Такое поведение подтверждает возможность механической передачи вируса [26].

При проведении лабораторного эксперимента было обнаружено, что *St. calcitrans* являются ПЦР-положительными в течение 24 ч после кровососания, но не могут быть источником для передачи вируса восприимчивым животным на этой стадии. Попытка ученых продемонстрировать передачу инфекции с помощью мух-жигалок не увенчалась успехом [3].

Передача вируса насекомыми спустя 24 ч кровососания описана в работе других исследователей. Поскольку для мух-жигалок характерно прерывистое питание, а вирус, как предполагается, передается механическим путем, его трансмиссия после такого длительного периода между кровососанием инфицированного животного и поиском нового восприимчивого хозяина не может гарантировать 100%-ю сохранность вируса в полевых условиях. Однако эти насекомые могут передавать другой каприпоксвирус, схожий с вирусом ЗУД [30]. Поэтому для определения роли *St. calcitrans* как вектора ЗУД необходимо дальнейшее изучение насекомых при более коротких периодах между укусами инфицированного и восприимчивого КРС.

Существуют данные, показывающие, что относительная распространенность мух-жигалок во время вспышек ЗУД (конец июля – начало сентября) была значительно выше, чем других двукрылых за тот же период. Для подтверждения этих результатов I. Yeruham и соавт. (1995) использовали созданную на основании данных за несколько лет модель популяции насекомых в неблагополучных районах, зависимой от метеорологических параметров [27]. Показано, что количество вспышек коррелировало с обилием *St. calcitrans*. Эта модель свидетельствует о том, что популяция этих мух достигла пика в месяцы начала вспышек на молочных фермах с привязным содержанием животных. Также было обнаружено более низкое количество мух-жигалок в течение октября и ноября, когда забо-

левание было зарегистрировано в соседних фермах, где выпас скота происходит в поле. Эти данные позволили предположить, что мухи-жигалки являются потенциальным вектором ЗУД на молочных фермах и, возможно, существует и другой вектор, участвующий в передаче вируса в стадах на пастбищах [17].

Основными подозреваемыми в передаче ЗУД во время вспышек являются гематофаги. На сегодняшний день единственным двукрылым насекомым, которое выполняет полную передачу ЗУД (зараженное насекомое способно заражать восприимчивых животных), является комар *Stegomyia aegypti* (*Aedes aegypti*) (Diptera: *Culicidae*) [21]. Эти комары способны участвовать в механической передаче вируса от инфицированного к восприимчивому КРС в течение 6 сут после кровососания. Существует мнение, что вирус локализуется в определенных участках тела насекомого. Например, *Ae. aegypti*, которые питались на миксоматозных поражениях у кроликов, содержали больше вируса в голове, чем в других частях тела [14].

Гематофагический способ питания, характерный для москитов, делает их идеальными кандидатами для механической передачи ЗУД. В подтверждение данного предположения V. M. Carn и R. P. Kitching продемонстрировали, что внутривенная инокуляция вируса животным приводит к массовой диссеминации вируса внутри организма животного [5]. Поэтому вполне вероятно, что другие виды комаров также могут быть потенциальными векторами, однако нужны дополнительные исследования для изучения роли каждого отдельного вида в эпизоотологии ЗУД КРС.

Важно отметить, что передача вируса насекомыми возможна только в том случае, если имеет место прерванный цикл питания на инфицированном животном с последующим завершением на восприимчивом [3].

Некровососущие мухи никогда не рассматривались в качестве вектора ЗУД, так как существует мнение, что инфекция передается в основном через укусы кровососущих насекомых [5]. Во время произошедшей в 2017 г. вспышки ЗУД КРС на территории РФ в полевых условиях провели отлов домашних мух (*Musca domestica*) липкими лентами. При исследовании, проведенном в ФГБУ «ВНИИЗЖ», в насекомых обнаружена вирусная ДНК вакцинного штамма вируса ЗУД [8]. Это, вероятно, связано с попаданием вируса в организм насекомых во время питания на вскрытых узелковых повреждениях кожи, содержащих вирус в высокой концентрации. Поэтому эпизоотологическая роль домашних мух, для которых открыта нодула или рана может служить потенциальным источником крови для питания, в трансмиссии вируса ЗУД требует дальнейшего изучения. Важно отметить, что выделение вируса на культуре клеток не проводилось, в связи с чем неизвестно, являлись ли мухи переносчиком инфекционного вируса или фрагментов генома. Высокая вероятность того, что на экзоскелете мух был именно вирус, согласуется с результатами других исследований, доказавших, что *M. domestica* способна переносить вирусные патогены домашней птицы и свиней [28].

Клещи вида *Amblyomma hebraeum* распространены в Южной Африке [29]. Персистентность вируса на разных стадиях развития клеща делает его возможным резервуаром перезимовки вируса ЗУД. J. C. Lubinga и соавт. показали, что *A. hebraeum* больше подходит

для выполнения функции поддержания вируса в зимние месяцы, чем мухи-жигалки, поскольку они могут выживать в течение длительного времени вне хозяина, используя сохраненные питательные вещества из крови, полученной во время предыдущих приемов пищи. Это может объяснить, где вирус ЗУД выживает между вспышками. Клещи из нимфы во взрослую особь превращаются в начале лета; тогда они, вероятно, передают вирус механически при укусе. Вирус у взрослых особей сохраняется в эпидермисе, сингангиях и репродуктивных органах, которые не подвергаются гистолиту во время линьки и, следовательно, могут служить источником для распространения вируса в других органах, включая слюнные железы. В другом исследовании авторы доказали механическую передачу вируса самцом *A. hebraeum* при отсутствии антител и низком уровне виремии [11, 22]. Результаты эксперимента, опубликованные авторами в 2014 г., указывают на наличие вирусной нуклеиновой кислоты у *A. hebraeum* и *Rhipicephalus appendiculatus*. Присутствие вируса подтверждали с использованием иммуногистохимического окрашивания различных органов клеща, включая среднюю кишку, слюнные железы, яичники, семенники и жировое тело. Также в исследовании экспериментально доказана возможность трансвариальной передачи возбудителя ЗУД самками *A. hebraeum*, *R. appendiculatus* и *R. decoloratus* личинкам, а затем животным-реципиентам [31].

Клещи рода *Rhipicephalus* широко распространены в южной части Африки, являются паразитами копытных животных. В зависимости от климатических условий за год развивается несколько поколений, причем пик численности питающихся самцов и самок приходится на лето [29]. Исследования, проведенные E. S. Turpurainen и соавт., продемонстрировали первое доказательство роли жестких (иксодовых) клещей (*Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus*) в передаче вируса ЗУД, обнаруженного в тканях и слюне взрослых клещей. После прерывания питания на экспериментально зараженном КРС самцы клещей были перенесены на неинфицированных животных, у которых затем наблюдали появление виремии и сероконверсии. Клещи способны не только передавать вирус, но и поддерживать его жизнеспособность на протяжении всего жизненного цикла без репликации, т. е. могут участвовать в перезимовке возбудителя ЗУД. Для *R. decoloratus* характерна трансвариальная передача вируса [22]. Однако жизненный цикл клещей, который включает длительный период привязанности к хозяину, не может объяснить быстрое появление обширных эпизоотий, поэтому возникает предположение, что эти насекомые могут служить лишь потенциальными резервуарами вируса.

Возможно, выживаемость вируса в тканях клещей более важна, чем фактическая репликация вируса в клетках, которая, согласно экспериментальным данным, не имеет места для вируса ЗУД. Однако, обобщая накопленный экспериментальный опыт в контексте «вирус-вектор», необходимо иметь в виду все возможные пути выживания и трансмиссии вирусных агентов при персистенции последних в популяции членистоногих.

По сравнению с внутривенной, внутрикожная инокуляция вируса у животных вызывает локальные поражения и существует низкая вероятность генерализованного заболевания [5].

F. Fenner и соавт. сообщали, что при миксоматозе кроликов для передачи заболевания комарами наиболее важно наличие генерализованных поражений у животных. Для осуществления трансмиссии вируса насекомые должны были питаться кровью на стадии виремии [13]. V. M. Carn и соавт. [5] в качестве источника инфекции для распространения каприпоксвирусов другим овцам и козам использовали животных со вторичными поражениями. Каприпоксвирусы, в том числе и ЗУД, вызывают множественные поражения, которые особенно привлекательны для кровососущих и некровососущих насекомых и в которых могут содержаться высокие концентрации вируса. Поэтому КРС с генерализованными поражениями можно считать наиболее вероятным источником трансмиссии вируса.

Исторически отмечалось, что вводимые ограничения на перемещение скота были недостаточной мерой для борьбы с заболеванием [24], хотя при возникновении некоторых вспышек их применение сдерживало распространение заболевания [18]. Важным для передачи ЗУД является внутривенная инокуляция вируса при укусах насекомых, которая приводит к генерализованной инфекции. Поэтому контроль потенциальных векторов, таких как мухи-жигалки *Stomoxys calcitrans*, комары *Aedes aegypti*, клещи *Amblyomma hebraeum* и *Rhipicephalus appendiculatus*, в отсутствие вакцинации является приоритетным для снижения последствий заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на международные усилия по ликвидации ЗУД КРС, вспышки данного заболевания периодически регистрируются в различных ранее благополучных странах. Основным препятствием к полному искоренению является отсутствие однозначных данных по трансмиссии вируса. Проведенный анализ литературы по данной теме показал, что наиболее вероятным механизмом передачи вируса является передача через насекомых, из-за чего инфекция отнесена к категории трансграничных заболеваний. Эпизоотологические исследования свидетельствуют о корреляции сезонности и частоты вспышек. Однако особенности жизненного цикла комаров и клещей не могут полностью объяснить скорость распространения вируса. Несмотря на наличие косвенных данных о роли насекомых, вспышки ЗУД КРС могут спорадически возникать в отсутствие векторов, что не исключает возможности контактной трансмиссии, например, через кожные поражения, являющиеся депо высоких концентраций вируса в течение длительного времени, или другие механизмы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali B. H., Obeid H. M. Investigation of the first outbreaks of lumpy skin disease in the Sudan // British Vet. J. – 1977. – Vol. 133 (2). – P. 184–189; DOI: 10.1016/S0007-1935(17)34140-4.
2. Analysis of post-blood meal flight distances in mosquitoes utilizing zoo animal blood meals / J. A. Greenberg, M. A. DiMenna, B. Hanelt, B. V. Hofkin // J. Vector Ecol. – 2012. – Vol. 37 (1). – P. 83–89; DOI: 10.1111/j.1948-7134.2012.00203.x.
3. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects / C. M. Chihota, L. F. Rennie, R. P. Kitching,

- P. S. Mellor // *Med. Vet. Entomol.* – 2003. – Vol. 17 (3). – P. 294–300; DOI: 10.1046/j.1365-2915.2003.00445.x.
4. Braverman Y., Yeruham I., Davidson M. Retrospective study on the epidemiology of the first lumpy skin disease outbreak in Israel in 1989 // *IXth International Congress of Virology: abstracts.* – Glasgow, Scotland, 8–13th August 1993. – P. 184.
 5. Carn V. M., Kitching R. P. An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling) // *Epidemiol. Infect.* – 1995. – Vol. 114 (1). – P. 219–226; DOI: 10.1017/S0950268800052067.
 6. Coetzer J. A. W. Lumpy skin disease // *Infectious Diseases of Livestock* / ed. J. A. W. Coetzer, R. C. Tustin. – 2nd ed. – Cape Town, South Africa: Oxford University Press, 2004. – P. 1268–1276.
 7. Davies F. G. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle // *British Vet. J.* – 1991. – Vol. 147 (6). – P. 489–503; DOI: 10.1016/0007-1935(91)90019-J.
 8. Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017 / A. Sprygin, Y. Pestova, P. Prutnikov, A. Kononov // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2018. – Vol. 65 (5). – P. 1137–1144; DOI: 10.1111/tbed.12897.
 9. Elhaig M. M., Selim A., Mahmoud M. Lumpy skin disease in cattle: Frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes / *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 2017. – Vol. 84 (1): a1393; DOI: 10.4102/ojvr.v84i1.1393.
 10. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016 / A. Sprygin, E. Artyuchova, Y. Babin [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2018. – Vol. 65 (6). – P. 1514–1521; DOI: 10.1111/tbed.12889.
 11. Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks / J. C. Lubinga, E. S. Tuppurainen, R. Mahlare [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2013. – Vol. 62 (2). – P. 174–182; DOI: 10.1111/tbed.12102.
 12. Family Poxviridae / R. M. Buller, B. M. Arif, D. N. Black [et al.] // *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* / ed. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff [et al.]. – San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 117–133.
 13. Fenner F., Day M. F., Woodroffe G. M. The mechanism of the transmission of myxomatosis in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) by the mosquito *Aedes aegypti* // *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* – 1952. – Vol. 30. – P. 139–152; DOI: 10.1038/icb.1952.13.
 14. Fenner F., Ratcliffe F. N. Myxomatosis. – Cambridge: Cambridge University Press, 1965. – 379 p.
 15. Genome of lumpy skin disease virus / E. R. Tulman, C. L. Afonso, Z. Lu [et al.] // *J. Virol.* – 2001. – Vol. 75 (15). – P. 7122–7130; DOI: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001.
 16. Haig D. A. Lumpy skin disease // *Bull. Epiz. Dis. Afr.* – 1957. – Vol. 5. – P. 421–430.
 17. High relative abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* is associated with lumpy skin disease outbreaks in Israeli dairy farms / E. Kahana-Sutin, E. Klement, I. Lensky, Y. Gottlieb // *Med. Vet. Entomol.* – 2017. – Vol. 31 (2). – P. 150–160; DOI: 10.1111/mve.12217.
 18. Lumpy skin disease epidemic in Kilimanjaro region / A. J. Kondela, H. M. Centres, J. F. G. Nyange, A. N. Mbise // *Proceedings of the Tanzanian Veterinary Association Scientific Conference.* – 1984. – Vol. 2. – P. 110–125.
 19. Macowan K. D. S. Observations on the epizootiology of lumpy skin disease during the first year of its occurrence in Kenya // *Bull. Epiz. Dis. Africa.* – 1959. – Vol. 7. – P. 7–20.
 20. Mathematical modelling and evaluation of the different routes of transmission of lumpy skin disease virus / R. Magori-Cohen, Y. Louzoun, Y. Herziger [et al.] // *Vet. Res.* – 2012. – Vol. 43:1; DOI: 10.1186/1297-9716-43-1.
 21. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) / C. M. Chihota, L. F. Rennie, R. P. Kitching, P. S. Mellor // *Epidemiol. Infect.* – 2001. – Vol. 126 (2). – P. 317–321; PMID: PMC2869697.
 22. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks / E. S. Tuppurainen, J. C. Lubinga, W. H. Stoltz [et al.] // *Epidemiol. Infect.* – 2013. – Vol. 141 (2). – P. 425–430; DOI: 10.1017/S0950268812000805.
 23. Proceedings of the 93rd Annual Meeting of the United States Animal Health Association, October 28 – November 3. – Las Vegas, Nevada, 1989. – 690 p.
 24. Reisen W. K. Epidemiology of vector-borne diseases // *Medical and Veterinary Entomology* / ed. G. R. Mullen, L. A. Durden. – Burlington: Academic Press, 2009. – P. 19–34.
 25. Review: Capripoxvirus diseases: Current status and opportunities for control / E. S. M. Tuppurainen, E. H. Venter, J. L. Shisler [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2017. – Vol. 64 (3). – P. 729–745; DOI: 10.1111/tbed.12444.
 26. Schofield S., Torr S. J. A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies // *Med. Vet. Entomol.* – 2002. – Vol. 16 (2). – P. 177–185; DOI: 10.1046/j.1365-2915.2002.00361.x.
 27. Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds / I. Yeruham, O. Nir, Y. Braverman [et al.] // *Vet. Res.* – 1995. – Vol. 137 (4). – P. 91–93; DOI: 10.1136/vr.137.4.91.
 28. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field / A. Barin, F. Arabkhazaeli, S. Rahbari, S. A. Madani // *Med. Vet. Entomol.* – 2010. – Vol. 24 (1). – P. 88–90; DOI: 10.1111/j.1365-2915.2009.00859.x.
 29. Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species / A. R. Walker, A. Bouattour, J.-L. Camicas [et al.]. – Edinburgh: Bioscience Reports, 2003. – 221 p.
 30. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): A review / F. Baldacchino, V. Muenworn, M. Desquesnes [et al.] // *Parasite.* – 2013. – Vol. 20:26; DOI: 10.1051/parasite/2013026.
 31. Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus* / J. C. Lubinga, E. S. M. Tuppurainen, J. A. W. Coetzer [et al.] // *Experimental and Applied Acarology.* – 2014. – Vol. 62 (1). – P. 67–75; DOI: 10.1007/s10493-013-9722-6.
 32. Von Backstrom U. Ngamiland cattle disease: preliminary report on a new disease, the etiological agent being probably of an infectious nature // *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* – 1945. – Vol. 16 (1). – P. 29–35.
 33. Weiss K. E. Lumpy skin disease virus // *Virology Monographs.* – Berlin, Heidelberg: Springer, 1968. – Vol. 3. – P. 111–131; DOI: 10.1007/978-3-662-39771-8_3.

REFERENCES

1. Ali B. H., Obeid H. M. Investigation of the first outbreaks of lumpy skin disease in the Sudan. *British Vet. J.* 1977; 133 (2): 184–189; DOI: 10.1016/S0007-1935(17)34140-4.
2. Analysis of post-blood meal flight distances in mosquitoes utilizing zoo animal blood meals. J. A. Greenberg, M. A. DiMenna, B. Hanelt, B. V. Hofkin. *J. Vector Ecol.* 2012; 37 (1): 83–89; DOI: 10.1111/j.1948-7134.2012.00203.x.
3. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. C. M. Chihota, L. F. Rennie, R. P. Kitching, P. S. Mellor. *Med. Vet. Entomol.* 2003; 17 (3): 294–300; DOI: 10.1046/j.1365-2915.2003.00445.x.
4. Braverman Y., Yeruham I., Davidson M. Retrospective study on the epidemiology of the first lumpy skin disease outbreak in Israel in 1989. *IXth International Congress of Virology: abstracts.* Glasgow, Scotland, 8–13th August 1993.
5. Carn V. M., Kitching R. P. An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiol. Infect.* 1995; 114 (1): 219–226; DOI: 10.1017/S0950268800052067.
6. Coetzer J. A. W. Lumpy skin disease. *Infectious Diseases of Livestock.* ed. J. A. W. Coetzer, R. C. Tustin. 2nd ed. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, 2004: 1268–1276.
7. Davies F. G. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. *British Vet. J.* 1991; 147 (6): 489–503; DOI: 10.1016/0007-1935(91)90019-J.
8. Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease

in Russia in 2017. A. Sprygin, Y. Pestova, P. Prutnikov, A. Kononov. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (5): 1137–1144; DOI: 10.1111/tbed.12897.

9. Elhaig M. M., Selim A., Mahmoud M. Lumpy skin disease in cattle: Frequency of occurrence in a dairy farm and a preliminary assessment of its possible impact on Egyptian buffaloes. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2017; 84 (1): a1393; DOI: 10.4102/ojvr.v84i1.1393.

10. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. A. Sprygin, E. Artyuchova, Y. Babbin [et al.]. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (6): 1514–1521; DOI: 10.1111/tbed.12889.

11. Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. J. C. Lubinga, E. S. Tuppurainen, R. Mhlanga [et al.]. *Transbound. Emerg. Dis.* 2013; 62 (2): 174–182; DOI: 10.1111/tbed.12102.

12. Family Poxviridae. R. M. Buller, B. M. Arif, D. N. Black [et al.]. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* ed. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff [et al.]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 117–133.

13. Fenner F., Day M. F., Woodroffe G. M. The mechanism of the transmission of myxomatosis in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) by the mosquito *Aedes aegypti*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1952; 30: 139–152; DOI: 10.1038/icb.1952.13.

14. Fenner F., Ratcliffe F. N. Myxomatosis. Cambridge: Cambridge University Press, 1965.

15. Genome of lumpy skin disease virus. E. R. Tulman, C. L. Afonso, Z. Lu [et al.]. *J. Virol.* 2001; 75 (15): 7122–7130; DOI: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001.

16. Haig D. A. Lumpy skin disease. *Bull. Epiz. Dis. Afr.* 1957; 5: 421–430.

17. High relative abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* is associated with lumpy skin disease outbreaks in Israeli dairy farms. E. Kahana-Sutin, E. Klement, I. Lensky, Y. Gottlieb. *Med. Vet. Entomol.* 2017; 31 (2): 150–160; DOI: 10.1111/mve.12217.

18. Lumpy skin disease epidemic in Kilimanjaro region. A. J. Kondela, H. M. Centres, J. F. G. Nyange, A. N. Mbise. *Proceedings of the Tanzanian Veterinary Association Scientific Conference.* 1984; 2: 110–125.

19. Macowan K. D. S. Observations on the epizootiology of lumpy skin disease during the first year of its occurrence in Kenya. *Bull. Epiz. Dis. Africa.* 1959; 7: 7–20.

20. Mathematical modelling and evaluation of the different routes of transmission of lumpy skin disease virus. R. Magoni-Cohen, Y. Louzoun, Y. Herziger [et al.]. *Vet. Res.* 2012; 43:1; DOI: 10.1186/1297-9716-43-1.

21. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). C. M. Chihota, L. F. Rennie, R. P. Kitching, P. S. Mellor. *Epidemiol. Infect.* 2001; 126 (2): 317–321; PMID: PMC2869697.

22. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. E. S. Tuppurainen, J. C. Lubinga, W. H. Stoltz [et al.]. *Epidemiol. Infect.* 2013; 141 (2): 425–430; DOI: 10.1017/S0950268812000805.

23. Proceedings of the 93rd Annual Meeting of the United States Animal Health Association, October 28 – November 3. Las Vegas, Nevada, 1989.

24. Reisen W. K. Epidemiology of vector-borne diseases. *Medical and Veterinary Entomology.* ed. G. R. Mullen, L. A. Durden. Burlington: Academic Press, 2009: 19–34.

25. Review: Capripoxvirus diseases: Current status and opportunities for control. E. S. M. Tuppurainen, E. H. Venter, J. L. Shisler [et al.]. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (3): 729–745; DOI: 10.1111/tbed.12444.

26. Schofield S., Torr S. J. A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Med. Vet. Entomol.* 2002; 16 (2): 177–185; DOI: 10.1046/j.1365-2915.2002.00361.x.

27. Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds. I. Yeruham, O. Nir, Y. Braverman [et al.]. *Vet. Res.* 1995; 137 (4): 91–93; DOI: 10.1136/vr.137.4.91.

28. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field. A. Barin, F. Arabkhazaeli, S. Rahbari, S. A. Madani. *Med. Vet. Entomol.* 2010; 24 (1): 88–90; DOI: 10.1111/j.1365-2915.2009.00859.x.

29. Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species. A. R. Walker, A. Bouattour, J.-L. Camicas [et al.]. Edinburgh: Bioscience Reports, 2003.

30. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): A review. F. Baldacchino, V. Muenworn, M. Desquesnes [et al.]. *Parasite.* 2013; 20:26; DOI: 10.1051/parasite/2013026.

31. Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. J. C. Lubinga, E. S. M. Tuppurainen, J. A. W. Coetzer [et al.]. *Experimental and Applied Acarology.* 2014; 62 (1): 67–75; DOI: 10.1007/s10493-013-9722-6.

32. Von Backstrom U. Ngamiland cattle disease: preliminary report on a new disease, the etiological agent being probably of an infectious nature. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 1945; 16 (1): 29–35.

33. Weiss K. E. Lumpy skin disease virus. *Virology Monographs.* Berlin, Heidelberg: Springer, 1968; 3: 111–131; DOI: 10.1007/978-3-662-39771-8_3.

Поступила 20.04.18

Принята в печать 15.01.19

ПРИМЕНЕНИЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ЯЩУРА В МОЛОКЕ КРС

А. М. Тимина¹, С. Н. Фомина², Т. К. Майорова³

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

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

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

РЕЗЮМЕ

Вирус ящура способен выделяться с молоком инфицированных животных и таким образом заражать восприимчивых особей. Оценивали возможность применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени для обнаружения вируса ящура в молоке крупного рогатого скота. Для приготовления образцов молока, инфицированных вирусом ящура, использовали штаммы А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005, С № 564, SAT-1 № 2033/Ботсвана, SAT-2/Саудовская Аравия, SAT-3/Bech 1/65. Для проверки специфичности ОТ-ПЦР-РВ использовали штаммы из коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: вируса везикулярной болезни свиней – О-72, вируса везикулярной экзантемы свиней – А-48, вируса везикулярного стоматита – Индиана. Полученные данные показали, что ОТ-ПЦР в реальном времени может успешно применяться для обнаружения вируса ящура в молоке инфицированных коров так же, как в эпителиальных тканях и культурах клеток. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ в образцах молока составляет 1–10 ТЦД₅₀/мл, специфичность метода – 100%. При определении основных валидационных характеристик метода доказано, что ОТ-ПЦР-РВ обладает высокой прецизионностью, специфичностью и чувствительностью и способна обнаруживать вирус ящура во всем его генетическом разнообразии. Таким образом, полученные данные показали, что ОТ-ПЦР-РВ является ценным методом для контроля молока и молочной продукции.

Ключевые слова: вирус ящура, молоко, ОТ-ПЦР в реальном времени, валидация.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание домашних и диких парнокопытных животных, способное наносить экономический ущерб в национальных масштабах. Свободные от ящура страны постоянно подвержены риску заноса заболевания из эндемичных регионов, таких как Азия, Африка и Южная Америка.

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 не эндемичен, однако существует постоянная угроза заноса болезни из соседних азиатских стран, прежде всего из Китая и Монголии. Вспышки ящура, вызванные заносом инфекции извне, регистрировались в современной России в 1995, 2000, 2004–2006 и 2010–2018 гг. [3].

Быстрая и точная диагностика является важным элементом контроля этой болезни, обладающей высокой контагиозностью и тяжелыми социально-экономическими последствиями.

У молочных коров заболевание характеризуется везикулярными поражениями в ротовой полости, на вымени, венчике копыт, в межкопытной щели, повы-

шением температуры и потерей молочной продуктивности. Вирус ящура выделяется с молоком инфицированных животных, участвуя таким образом в передаче инфекции [9].

Молоко является идеальной средой для лабораторной диагностики, поскольку оно доступно в любом количестве и его пробы легко собрать. Ряд исследователей применяли различные диагностические подходы при использовании образцов молока для контроля инфекций крупного рогатого скота и идентификации статуса отдельных животных по заболеванию [5, 8].

Как показали исследования S. M. Reid и соавт., вирус ящура появляется в молоке коров на 2-е–3-и сут после инфицирования до возникновения клинических признаков у экспериментально зараженных животных. Также было установлено, что вирус способен реплицироваться в тканях молочной железы и выделяться с молоком до 23 сут. Данными авторами показаны преимущества исследования молока коров методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в качестве инструмента доклинической диагностики ящура [9].

Исследования P. M. Tomasula и R. P. Konstance показали, что вирус ящура обнаруживается в молоке после инкубации проб при 37 °С, после хранения при комнат-

ной температуре и при 4 °С в течение 2 нед. Кроме того, вирус ящура можно обнаружить в пастеризованных продуктах. Такой метод, как вирусовыделение, не позволяет выявлять жизнеспособный вирус в термически обработанных образцах [7].

Как показывают предыдущие исследования специалистов, ОТ-ПЦР-РВ является ценным методом для лабораторного обнаружения вируса ящура в везикулах эпителиальной ткани, назальных смывах и пищеводно-глоточных образцах [3, 6, 8].

Целью работы было оценить возможность применения метода ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения вируса ящура в молоке, а также определить его основные валидационные характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе использовали: вирусы ящура А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005, С № 564, SAT-1 № 2033/Ботсвана, SAT-2/Саудовская Аравия, SAT-3/Bech 1/65, а также штаммы из коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: вируса везикулярной болезни свиней (ВБС) – О-72, вируса везикулярной экзантемы свиней (ВЭС) – А-48, вируса везикулярного стоматита (ВС) – Индиана.

Образцы молока, инфицированные вирусом ящура. На молоке здоровых дойных коров были приготовлены 10-кратные последовательные разведения вируса ящура трех актуальных серотипов (А, О, Азия-1) с концентрацией от 10^{-1} до 10^{-10} lg ТЦД₅₀/мл.

Выделение РНК из молока КРС проводили с использованием 6 М гуанидинизотиоцианата и стекловолокнистых фильтров GF/F, как описано А. Sherbakov и соавт. [4].

Постановка ОТ-ПЦР в реальном времени. В 25 мкл реакционной смеси содержалось: 5 пМ прямого и 5 пМ обратного праймеров; 5 пМ зонда TaqMan; 5 мкл РНК; 20 мкл смеси реактивов для проведения ПЦР-РВ

(Синтол, Москва), состоящей из 2,5 мкл ПЦР-буфера 10-кратной концентрации; 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы; 10 ед. MMLV-ревертазы; 12 мкл воды. Компоненты смешивали в 96-луночных оптических планшетах (Axugen). ПЦР проводили на амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) при следующем температурном режиме: 15 мин – обратной транскрипции, 5 мин – предварительной денатурации при 95 °С и 40 циклов реакции (денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг при 55 °С – 15 с, элонгация при 60 °С – 20 с). Сигналы флуоресценции регистрировала система CFX96 Real-Time System мультканальной детекции ПЦР-продуктов в режиме реального времени. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager и Microsoft Excel. Для установления порогового цикла C_t использовали два основных параметра: базовую линию, определяемую для каждой индивидуальной кривой, и пороговую линию, рассчитанную для данного флуорофора. Величина порогового цикла обратно пропорциональна log количества матрицы в реакционной смеси – чем ниже величина C_t, тем выше концентрация матрицы [3].

Статистическая обработка данных. Прецизионность в условиях сходимости (повторяемости) и воспроизводимости определяли как степень согласованности результатов множественных анализов одного образца [1, 2]. Коэффициент вариации (С) рассчитывали по формуле [1]:

$$C = \frac{\sigma}{X_{cp}} \times 100\%,$$

где X_{cp} – средняя величина порогового цикла, определяемого в ПЦР-РВ;

σ – среднее квадратичное отклонение, которое определяется по формуле:

$$\sigma = \frac{X_{max} - X_{min}}{K}.$$

Таблица 1
Определение концентрации вируса ящура методом ОТ-ПЦР-РВ в образцах молока

Концентрация вируса ящура в образцах, lg ТЦД ₅₀ /мл	Среднее значение порогового цикла (C _t), полученное в трех повторностях		
	А № 2177/Амурский/2013	О № 2123/Южная Осетия/2011	Азия-1 № 1987/Амурский/2005
6,0	16,09	16,76	18,36
5,0	17,74	20,30	21,00
4,0	21,58	23,81	24,09
3,0	23,73	27,67	27,66
2,0	26,69	30,80	29,84
1,0	29,40	36,83	32,48
0,1	32,38	н/о	34,71
0,01	н/о	н/о	н/о
0,001	н/о	н/о	н/о
0,0001	н/о	н/о	н/о

н/о – C_t не определен, что означает отрицательный результат ОТ-ПЦР-РВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Работа по оценке использования ОТ-ПЦР-РВ при обнаружении вируса ящура в молоке КРС проводилась в соответствии с планом НИР. Для реализации этой задачи были приготовлены образцы молока КРС, инфицированные вирусом ящура. Пробы готовили методом последовательных разведений с 10-кратным шагом. Каждая проба молока содержала 10% вирусной суспензии таким образом, чтобы конечная концентрация вируса в образце составляла от 10^{-1} до 10^{-10} Ig ТЦД₅₀/мл. Исходя из эпизоотической ситуации были выбраны три актуальных штамма вируса ящура: А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1

Таблица 2
Значения порогового цикла и коэффициенты вариации ОТ-ПЦР-РВ для образца молока, содержащего вирус ящура А № 2177/Амурский/2013

Внутри одного прогона		На другом приборе		Другим оператором	
№ повтора	C _t	№ повтора	C _t	№ повтора	C _t
1	16,12	1	16,24	1	16,32
2	16,30	2	17,02	2	16,74
3	16,14	3	16,66	3	16,08*
4	16,17	4	16,06	4	16,16
5	16,21	5	16,14	5	16,81
6	16,27	6	17,01	6	16,27
7	16,31	7	16,83	7	16,98
8	16,30	8	16,41	8	16,22
9	16,28	9	16,29	9	17,11
10	16,27	10	17,04	10	16,17
11	16,23	11	16,21	11	17,01
12	16,23	12	16,47	12	16,37
13	16,18	13	16,32	13	16,49
14	16,17	14	16,94	14	16,47
15	16,19	15	16,83	15	16,29
16	16,21	16	16,81	16	16,64
17	16,27	17	16,19	17	16,36
18	16,12	18	16,71	18	16,18
19	16,32	19	16,29	19	16,41
20	16,26	20	16,28	20	17,19**
C = 1,23					
C = 5,6					
		C = 6,72			

* минимальное значение C_t; ** максимальное значение C_t.

№ 1987/Амурский/2005 – и приготовлены по 10 разведений вируса в молоке.

Для определения специфичности метода использовали образцы молока, содержащие 10% вирусной суспензии семи серотипов вируса ящура и гетерологичных вирусов с везикулярным синдромом. Все анализы проводили в трех повторностях.

В ходе исследования были определены такие показатели, как аналитическая чувствительность реакции, прецизионность и аналитическая специфичность.

Определение аналитической чувствительности реакции. Аналитическую чувствительность ОТ-ПЦР-РВ определяли на серии последовательных 10-кратных разведений в образцах молока трех культуральных препаратов вируса ящура (штаммы А № 2177/Амурский/2013, О № 2123/Южная Осетия/2011, Азия-1 № 1987/Амурский/2005) с известной первоначальной концентрацией. Концентрацию вируса в полученных образцах молока определяли исходя из значений порогового цикла (C_t). ОТ-ПЦР-РВ обнаруживала штаммы вируса ящура А № 2177/Амурский/2013 и Азия-1 № 1987/Амурский/2005 в концентрации до 0,1 Ig ТЦД₅₀/мл (т. е. 1 ТЦД₅₀/мл), а О № 2123/Южная Осетия/2011 – в концентрации до 1 Ig ТЦД₅₀/мл (т. е. 10 ТЦД₅₀/мл) (табл. 1).

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ при выявлении вируса ящура в молоке составляет 1–10 ТЦД₅₀/мл. Различие в аналитической чувствительности реакции для разных штаммов, вероятно, объясняется выбранным 10-кратным шагом разведения образцов, а также возможной неточностью при определении титра вируса в культуре клеток.

Полученные результаты подтверждают, что метод ОТ-ПЦР-РВ способен выявлять вирус ящура в молоке с такой же чувствительностью, как в эпителиальных тканях и клеточных культурах [3].

Оценка прецизионности реакции. Прецизионность реакции определяли в условиях сходимости и воспроизводимости. Прецизионность в условиях сходимости оценивали, измеряя вариабельность результатов реакции внутри одного прогона. Для этого один и тот же образец молока, содержащий 6 Ig ТЦД₅₀/мл вируса ящура А № 2177/Амурский/2013, тестировался одновременно в 20 повторностях одним оператором на одном приборе.

Прецизионность в условиях воспроизводимости оценивали, измеряя вариабельность результатов реакции между прогонами. Для этого один и тот же образец тестировался в 20 повторностях одним оператором на двух приборах в разное время, а также двумя операторами на разных приборах.

Значение коэффициента вариации составляло 1,23% при проведении ОТ-ПЦР-РВ в 20 повторах одним оператором, 5,6% – при проведении реакции одним оператором на двух приборах в разное время и 6,72% при проведении реакции двумя операторами на двух приборах. Суммарный коэффициент вариации составлял 6,76% (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой прецизионности ОТ-ПЦР-РВ.

Определение аналитической специфичности реакции. Аналитическую специфичность ОТ-ПЦР-РВ проверяли на РНК, полученной из образцов молока КРС, содержащих вирусы ящура семи серотипов. Также использовали другие вирусы (ВБС, ВЭС, ВС), разведенные в молоке, и цельное молоко от здоровых коров.

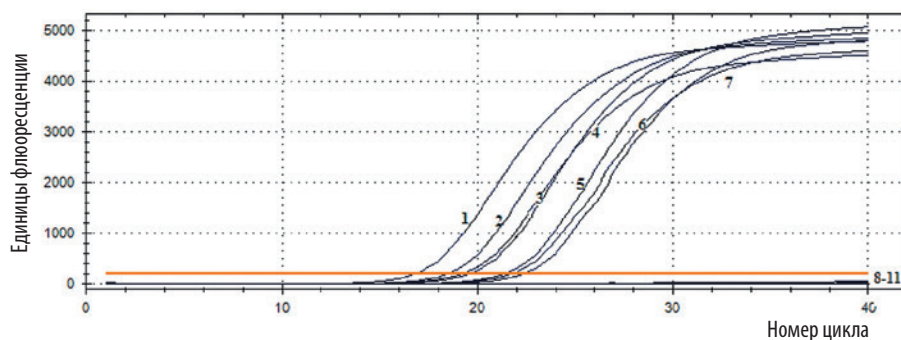


Рис. Аналитическая специфичность ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения РНК вируса ящура в молоке

1–7 – образцы молока, содержащие вирус ящура семи серотипов;

8–11 – молоко здоровых коров и образцы молока, содержащие вирусы ВБС, ВЭС, ВС.

Положительный результат был получен при исследовании образцов молока, содержащих вирус ящура семи серотипов (см. рис.). Пробы, содержащие РНК других вирусов, а также молоко здоровых животных дали отрицательные результаты, что свидетельствует о специфичности метода.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее проведенные исследования показали, что ОТ-ПЦР в реальном времени является современным методом для выявления генома вируса ящура в тканях эпителия инфицированных животных и культурах клеток [3]. Результаты, полученные в рамках данной работы, показывают, что ОТ-ПЦР-РВ может успешно применяться также для обнаружения вируса ящура в молоке инфицированных коров.

В результате эксперимента определены некоторые валидационные характеристики ОТ-ПЦР-РВ: прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости, аналитическая специфичность и чувствительность, показана возможность использования метода для выявления вируса ящура в молоке коров дойного стада.

Проведенные исследования показали, что ОТ-ПЦР-РВ обеспечивает высокую прецизионность, специфичность и чувствительность анализа. Коэффициент вариации составлял 6,72%.

Чувствительность метода в экспериментах составляла от 1 до 10 ТЦД₅₀/мл в зависимости от штамма вируса ящура. ОТ-ПЦР-РВ позволяет обнаружить вирус ящура, разведенный в молоке в 1 000 000 раз. По данным S. M. Reid и соавт. [9], такая чувствительность позволяет обнаружить наличие инфицированного животного в стаде, следовательно, метод пригоден для исследования сборных проб молока. Существует возможность выявления инфекции даже после того, как молоко от нескольких стад объединят в общий танкер.

Вирус ящура отличается чрезвычайно высоким уровнем генетического разнообразия. Проведенные исследования показывают, что все семь серотипов вируса успешно обнаруживаются в молоке так же, как и в эпителии больных животных [3], что подтверждает способность метода обнаруживать широкий генетический спектр вируса ящура.

ВЫВОДЫ

Показана возможность применения ОТ-ПЦР в реальном времени как современного метода для обнаружения вируса ящура в молоке КРС. Определены основные

валидационные характеристики метода, предназначенного для обнаружения РНК вируса ящура всех серотипов.

Результаты экспериментальных исследований доказывают, что метод обладает высокой прецизионностью, специфичностью и чувствительностью и способен обнаруживать вирус ящура во всем его генетическом разнообразии даже при значительном разведении.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поляков И. В., Соколова Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике. – Л.: Медицина, 1975. – С. 26–30.
2. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. – URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP-Валидация-аналитических-методик-теория> (дата обращения: 02.12.18).
3. Тимина А. М., Щербakov А. В. Определение основных характеристик ОТ-ПЦР в реальном времени, предназначенной для обнаружения вируса ящура всех серотипов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2016. – Т. 14. – С. 7–19.
4. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis / A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev // Vet. Quart. – 1998. – V. 20 (Suppl. 2). – P. 32–34; DOI: 10.1080/01652176.1998.9694962.
5. Drew T. W., Yapp F., Paton D. J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR / Vet. Microbiol. – 1999. – Vol. 64 (2–3). – P. 145–154; DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00266-1.
6. Enhanced laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time polymerase chain reaction / A. E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King [et al.] // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2004. – Vol. 23 (3). – P. 1003–1009. – URL: <http://wahis2-devt.oie.int/doc/ged/D1339.PDF>.
7. Tomasula P. M., Konstance R. P. The survival of foot-and-mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products // J. Dairy Sci. – 2004. – Vol. 87 (4). – P. 1115–1121; DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73258-0.
8. Use of an internal standard in a TaqMan® nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus / G. S. Heath, D. P. King, J. L. E. Turner [et al.] // Vet. Microbiol. – 2003. – Vol. 96 (4). – P. 357–366; DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.09.006.
9. Utility of automated real-time RT-PCR for the detection of foot-and-mouth disease virus excreted in milk / S. M. Reid, S. Parida, D. P. King [et al.] // Vet. Res. – 2006. – Vol. 37 (1). – P. 121–132; DOI: 10.1051/vetres:2005040.

Поступила 13.12.18

Принята в печать 01.02.19

USE OF REAL-TIME qRT-PCR FOR FMD VIRUS DETECTION IN CATTLE MILK

A. M. Timina¹, S. N. Fomina², T. K. Mayorova³

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

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

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

SUMMARY

FMDV can be shed with milk of infected animals and infect susceptible animals. The possibility of using real-time qRT-PCR for FMD virus detection in cattle milk was assessed. To prepare samples of FMDV infected milk the following strains were used: A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005, C No. 564, SAT-1 No. 2033/Botswana, SAT-2/Saudi Arabia, SAT-3/Bech 1/65. For specificity test swine vesicular disease O-72 strain, Vesicular Exanthema of Swine A-48 strain and vesicular stomatitis virus Indiana strain from FGBI "ARRIAH" collection were used. The obtained data showed that real time qRT-PCR can be successfully used for the virus detection in milk of infected cows as well as in epithelium and cell cultures. Analytical sensitivity of real-time qRT-PCR in milk samples is 1–10 TCD₅₀/ml, the method specificity is 100%. When identifying basic validation characteristics of the method it was proven that real-time qRT-PCR demonstrates precision and sensitivity and can detect FMDV in its genetic diversity. So, the detected data showed that the real-time qRT-PCR is a precious method of milk and dairy product control.

Key words: FMD virus, milk, real-time qRT-PCR, validation.

INTRODUCTION

FMD is a highly contagious disease of domestic and wild cloven hoofed animals capable of causing great economic damage nationwide. FMD free countries are under constant risk of the disease introduction from endemic regions, such as Asia, Africa and South America.

The disease agent is non-enveloped RNA-containing FMDV, *Aphthovirus* Genus, *Picornaviridae* family. There are seven types of the virus: O, A, C, Asia-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3. Within each type there are many genetic and antigenic variants of the virus.

FMD is not endemic in Russia, however there is a constant threat of the virus introduction from the neighboring Asian countries, primarily from China and Mongolia. FMD outbreaks caused by the infection introduction from other countries were reported in Russia in 1995, 2000, 2004–2006 and 2010–2018 [3].

Rapid and precise diagnosis is a key element of the control of the disease having high contagiousness and hard social and economic consequences.

In milk cows the disease is characterized by vesicular lesions in the mouth, on the udder, on the coronary band, in the interdigital cleft, by fever and decreased milk yield. FMDV is shed with milk of infected animals facilitating the infection transmission [9].

Milk is a perfect medium for laboratory diagnosis as it is available in any quantity and its samples are easily

collected. Several researchers applied different diagnostic approaches when using milk samples for cattle infection control and identification of the disease status of individual animals [5, 8].

According to the researches of S. M. Reid and et al., FMDV can be observed in cow milk on day 2–3 after infection until the experimentally infected animals demonstrate clinical signs. It was also established that the virus can replicate in the mammary gland and shed with milk for up to 23 days. The authors showed benefits of real-time qRT-PCR tests of cow milk as an instrument of preclinical FMD diagnosis [9].

P. M. Tomasula and R. P. Konstance's investigations demonstrated that FMDV is detected in milk after sample incubation at 37 °C, after storage at room temperature and at 4 °C for two weeks. Besides, FMDV can be detected in pasteurized products. Such method as virus isolation can not detect the viable virus in heat treated samples [7].

According to the previous researches real-time qRT-PCR is a valuable method for laboratory FMDV detection in epithelium vesicles, nasal swabs and esophageal samples [3, 6, 8].

The purpose of the research was to assess the possibility of real-time qRT-PCR use for FMDV detection in milk and to identify its basic validation characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. The following viruses were used in the research: FMD viruses: A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005, C No. 564, SAT-1 No. 2033/Botswana, SAT-2/Saudi Arabia, SAT-3/Bech 1/65, as well as swine vesicular disease virus strain O-72, VESV A-48 strain and vesicular stomatitis virus Indiana strain from FGBI "ARRIAH" collection.

FMDV infected milk samples. 10-fold FMDV serial dilutions of three circulating serotypes (A, O, Asia-1) with the concentration of 10⁻¹–10⁻¹⁰ lg TCD₅₀/ml were prepared using milk of normal milk cows.

RNA isolation from cattle was performed using 6 M guanidine isothiocyanate and fibrous glass filter GF/F as described by A. Sherbakov et al. [4].

Real-time qRT-PCR. 25 µl of reaction mixture contained 5 pm direct and reverse primers, 5 pm TaqMan probe, 5 µl of RNA, 20 µl of the reaction mixture for real time PCR (Sintol, Moscow), containing 2.5 µl of PCR buffer (10-fold concentration); 2.5 µl of 25 mM MgCl₂; 2.5 µl of 2.5 mM dNTP; 1 unit. Taq-DNA-polimerase; 10 units MMLV-reverse transcriptase and 12 µl of water. The components were mixed in 96-well optical plates (Axygen). PCR was

performed using amplifier C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) at the following temperature conditions: 15 minutes – reverse transcription, 15 minutes – preliminary denaturation at 95 °C and 40 cycles of reaction (denaturation at 95 °C – 15 s, annealing at 55 °C – 15 s, elongation at 60 °C – 20 s). CFX96 Real-Time PCR Detection System was used for recording fluorescence signals. The obtained data were analyzed using Bio-Rad CFX Manager software and Microsoft Excel. To establish C_t threshold cycle two basic parameters were used: basic line determined for each individual curve; threshold line, calculated for this phluorophore. The threshold cycle value is inversely proportional to log of a matrix in the reaction mixture – the less C_t value the higher the matrix concentration [3].

Statistical data processing. Precision in repeatability and reproducibility was determined as the level of consistency of results of multiple analyses of one sample [1, 2]. Coefficient of variation (C) was calculated basing on the following formula [1]:

$$C = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\%,$$

where $\bar{X}$ – mean value of the threshold cycle determined by real-time PCR;

σ – mean square deviation, calculated using the following formula:

$$\sigma = \frac{X_{\max} - X_{\min}}{K}.$$

RESULTS

The research aimed at assessment of real-time qRT-PCR use for FMDV detection in cattle milk was performed according to the Research Plan. To implement this task FMDV infected cattle milk samples were prepared. The samples were prepared using 10-fold serial dilutions. Each sample contained 10% virus suspension so that the virus final concentration in the sample was 10^{-1} – 10^{-10} lg TCD₅₀/ml. Basing on the epidemic situation three relevant FMD strains were selected: A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005 – and 10 virus dilutions in milk were prepared.

To determine the method specificity milk samples containing 10% virus suspension of seven virus serotypes and heterologous vesicular viruses were used. All analyses were performed in triplicates.

During the investigation such parameters as analytical sensitivity of the reaction, precision and analytical specificity were determined.

Determination of the reaction analytical sensitivity. Analytical sensitivity of real-time qRT-PCR was determined using 10-fold serial dilutions of three FMDV cultural FMDV virus preparations in milk samples (A No. 2177/Amursky/2013, O No. 2123/South Ossetia/2011, Asia-1 No. 1987/Amursky/2005 strains) with known original concentration. The virus concentration in the milk samples was determined basing on the threshold cycle values (C_t). Real-time qRT-PCR detected FMDV strains A No. 2177/Amursky/2013 and Asia-1 No. 1987/Amursky/2005 at the concentration of up to 0.1 lg TCD₅₀/ml (i. e. 1 TCD₅₀/ml), and O No. 2123/South Ossetia/2011 – at the concentration of up to 1 lg TCD₅₀/ml (i. e. 10 TCD₅₀/ml) (Table 1).

So, the performed experiments showed that when detecting FMDV in milk analytical sensitivity of real-time qRT-PCR is 1–10 TCD₅₀/ml. Difference in analytical sensitivity of the reaction for different strains is probably explained

Table 1
Determination of FMDV concentration in milk samples using real-time qRT-PCR

FMDV concentration in samples, lg TCD ₅₀ /ml	Threshold cycle mean value (C_t), in triplicates		
	A No. 2177/Amursky/2013	O No. 2123/South Ossetia/2011	Asia-1 No. 1987/Amursky/2005
6.0	16.09	16.76	18.36
5.0	17.74	20.30	21.00
4.0	21.58	23.81	24.09
3.0	23.73	27.67	27.66
2.0	26.69	30.80	29.84
1.0	29.40	36.83	32.48
0.1	32.38	n/d	34.71
0.01	n/d	n/d	n/d
0.001	n/d	n/d	n/d
0.0001	n/d	n/d	n/d

n/d – C_t not determined, which means that real-time qRT-PCR result is negative.

by the chosen 10-fold sample dilution and possible inaccuracy of the virus titer determination in the cell culture.

The obtained results confirm that real-time qRT-PCR can detect FMDV in milk and the sensitivity is the same as in epithelium tissues and cell cultures [3].

Assessment of the reaction precision. Precision of the reaction was determined under repeatability and reproducibility conditions. Precision under repeatability conditions was assessed by measuring the variability of the results within one run. For that purpose the same milk sample containing 6 lg TCD₅₀/ml of FMDV A No. 2177/Amursky/2013, was tested simultaneously in 20 replicates by one operator using the same machine.

The coefficient of variation was 1.23% when real-time qRT-PCR as performed by one operator in 20 replicates, 5.6% – when performing reaction by one operator using two machines at a different time, and 6.72% when performing the reaction by two operators using two machines (Table 2).

The obtained results are indicative of high real-time qRT-PCR precision.

Determination of the analytical specificity of the reaction. Analytical specificity of real-time qRT-PCR was determined using RNA from cattle milk samples containing seven serotypes of FMDV. Other viruses (SVD, VES, VS), diluted in milk and unskimmed milk from normal cows were also used. A positive result was obtained when testing milk samples containing seven FMDV serotypes (figure). Samples containing RNA of other viruses as well as milk from normal animals demonstrated negative results which is indicative of the method specificity.

DISCUSSION

The previously performed tests showed that real-time qRT-PCR is a contemporary method for FMDV genome detection in epithelium of infected animals and cell cultures [3]. Results obtained during this research showed that real-time qRT-PCR can be successfully applied for FMDV detection in milk of infected cows.

Table 2
Threshold cycle values and real-time qRT-PCR coefficients of variation for the milk sample containing FMDV A No. 2177/Amursky/2013

Within one run		Different machine		Different operator	
No Run	C _t	No repeat	C _t	No repeat	C _t
1	16.12	1	16.24	1	16.32
2	16.30	2	17.02	2	16.74
3	16.14	3	16.66	3	16.08*
4	16.17	4	16.06	4	16.16
5	16.21	5	16.14	5	16.81
6	16.27	6	17.01	6	16.27
7	16.31	7	16.83	7	16.98
8	16.30	8	16.41	8	16.22
9	16.28	9	16.29	9	17.11
10	16.27	10	17.04	10	16.17
11	16.23	11	16.21	11	17.01
12	16.23	12	16.47	12	16.37
13	16.18	13	16.32	13	16.49
14	16.17	14	16.94	14	16.47
15	16.19	15	16.83	15	16.29
16	16.21	16	16.81	16	16.64
17	16.27	17	16.19	17	16.36
18	16.12	18	16.71	18	16.18
19	16.32	19	16.29	19	16.41
20	16.26	20	16.28	20	17.19**
C = 1.23					
C = 5.6					
		C = 6.72			

* minimum C_t; ** maximum C_t.

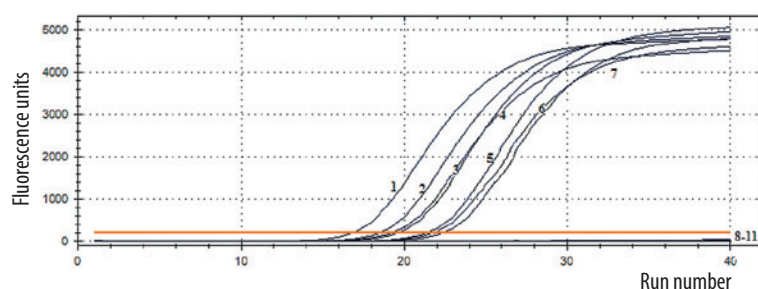


Figure. Analytical specificity of real-time qRT-PCR for detection of FMDV RNA in milk

1–7 – milk samples containing seven FMDV serotypes;
8–11 – milk from normal cows and milk samples containing SVDV, VESV, VSV.

As a result of the performed research several validation characteristics of real-time qRT-PCR were determined: precision under repeatability and reproducibility conditions, analytical specificity and sensitivity. Also the results of the research demonstrate the possibility to apply the method for FMDV detection in milk of a dairy herd.

The performed tests showed that real-time qRT-PCR has high precision, specificity and sensitivity. Coefficient of variation was 6.72%.

Sensitivity of the method was 1–10 TCD₅₀/ml depending on the FMDV strain. Real-time qRT-PCR allows detection of 1:1,000,000 FMDV dilution in milk. According to S. M. Reid et al. [9] such sensitivity allows detecting an infected animal in the herd, so, the method can be used for testing composite milk samples. It is also possible to detect the infection even after the milk from different has been pooled into one tanker.

FMDV is characterized by a high level of genetic diversity. The performed tests show, that all seven FMDV serotypes are successfully detected in milk as well as in epithelium of sick animals [3], which confirms the capability of the method to detect a wide spectrum of the FMD virus.

CONCLUSIONS

The possibility of real-time qRT-PCR use as a contemporary method for FMDV detection in milk was demonstrated.

Major validation characteristics of the method for detection of RNA of all FMDV serotypes were determined.

Results of the experimental tests prove that the method has high precision, specificity and sensitivity and can detect FMDV in its genetic diversity even if it is diluted.

Conflict of interests. The authors claim no conflict of interests.

REFERENCES

1. Polyakov I. V., Sokolova N. S. Practical guide for medical statistics [Prakticheskoe posobie po medicinskoj statistike]. L.: Medicine, 1975 (in Russian).
2. Practical course on GMP. Validation of analytical methods: theory [Praktikum po GMP. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya]. P. Nosyrev, M. Nosyreva, T. Rasskazova, N. Korneyeva. URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик--теория> (access date: 02.12.18) (in Russian).
3. Timina A. M., Scherbakov A. V. Determination of major characteristics of the Real Time qRT PCR for detection of all FMDV serotypes [Opredelenie osnovnykh harakteristik OT-PCR v real'nom vremeni, prednaznachenoj dlya obnaruzheniya virusa yashchura vsekhn serotipov]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2016; 14: 7–19 (in Russian).
4. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis. A. Sherbakov, N. Lomakina, V. Drygin, A. Gusev. *Vet. Quart.* 1998; 20 (Suppl. 2): 32–34; DOI: 10.1080/01652176.1998.9694962.
5. Drew T. W., Yapp F., Paton D. J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 1999; 64 (2–3): 145–154; DOI: 10.1016/S0378-1135(98)00266-1.
6. Enhanced laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time polymerase chain reaction. A. E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King [et al.]. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2004; 23 (3): 1003–1009. URL: <http://wahis2-devt.oie.int/doc/ged/D1339.PDF>.
7. Tomasula P. M., Konstance R. P. The survival of foot-and-mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products. *J. Dairy Sci.* 2004; 87 (4): 1115–1121; DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73258-0.
8. Use of an internal standard in a TaqMan® nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. G. S. Heath, D. P. King, J. L. E. Turner [et al.]. *Vet. Microbiol.* 2003; 96 (4): 357–366; DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.09.006.
9. Utility of automated real-time RT-PCR for the detection of foot-and-mouth disease virus excreted in milk. S. M. Reid, S. Parida, D. P. King [et al.]. *Vet. Res.* 2006; 37 (1): 121–132; DOI: 10.1051/vetres:2005040.

Submitted on 13.12.18

Approved for publication on 01.02.19

УДК 637.12.046

DOI 10.29326/2304-196X-2019-1-28-29-33

МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ В СЫРОМ МОЛОКЕ КОРОВ

Е. С. Кандинская¹, С. В. Редькин², Г. В. Чебакова³¹ Соискатель, ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия, e-mail: kandinskaya@gmail.com² Доцент, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия³ Доцент, кандидат ветеринарных наук, ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Молоко является уникальным по пищевой ценности и значимости для биохимических процессов в человеческом организме природным продуктом. Его состав сбалансирован по содержанию минеральных компонентов, в том числе кальция. Кальций необходим для протекания множества пластических обменных процессов и находится в молоке в легкоусвояемой и сбалансированной с фосфором форме. Поэтому снижение его содержания в молоке влияет на метаболизм человека, особенно детей. В работе приведены результаты лабораторных исследований 400 образцов молока клинически здоровых высокопродуктивных коров голштинской и черно-пестрой породы. Указанные образцы получены из 40 животноводческих хозяйств Московской области в 2001–2017 гг. Изучены органолептические, физико-химические и микробиологические показатели качества сырого молока. Показано, что количество кальция в молоке зависит от сезона получения сырья. Отмечается, что, несмотря на тенденцию к повышению анализируемого показателя в осенний период, большинство исследованных образцов молока не

соответствуют ветеринарно-санитарным показателям качества. Проведенный мониторинг показал, что в последнее время наблюдается снижение содержания кальция в молоке коров и в молочных продуктах, предназначенных для детского питания. Установлено, что среднее значение содержания кальция в сыром молоке находится на уровне 900–950 мг, а диапазон колебаний составляет от 700 до 1100 мг кальция в 1 л молока. Предлагается дальнейшая схема исследования, которая основана на анализе таких факторов, как истинный белок, рацион кормления, биологически активные добавки, и которая позволит комплексно оценить экзогенные факторы, влияющие на содержание и биодоступность кальция в молоке, и приблизить общероссийские критерии оценки качества и безопасности продуктов к европейским стандартам.

Ключевые слова: молоко и молочная продукция, мониторинг, ветеринарно-санитарная оценка качества, содержание кальция в молоке.

UDC 637.12.046

MONITORING OF CALCIUM CONTENT OF RAW COW MILK

Ye. S. Kandinskaya¹, S. V. Redkin², G. V. Chebakova³¹ Post-Graduate Student, FEI HE Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – Moscow Academy of Veterinary Medicine named after K. I. Skriabin, Moscow, Russian Federation, e-mail: kandinskaya@gmail.com² Associate Professor, Candidate of Science (Biology), FEI HE Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – Moscow Academy of Veterinary Medicine named after K. I. Skriabin, Moscow, Russian Federation³ Associate Professor, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FEI HE Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – Moscow Academy of Veterinary Medicine named after K. I. Skriabin, Moscow, Russian Federation

SUMMARY

Milk is a natural food product that is unique in its nutritive value and significance for human organism. Its composition is balanced in major biochemical components as well as mineral components including calcium. Calcium is essential for many metabolic processes and is contained in milk in easily digestible and phosphorus-balanced form. Therefore, decrease in its content in milk creates prerequisites for insufficient meeting the body need in the said microelement and has an effect on human metabolism especially in children. Results of laboratory testing of 400 milk samples collected from clinically healthy Holstein and Black and White Spotted cows kept on 40 farms located in the Moscow Oblast in 2001–2017 are presented. The raw milk was examined for the following quality indicators: sensory, physical and chemical as well as microbiological parameters. It was found that calcium concentration in milk depended on the season. It was shown that the majority of tested milk samples did not

comply with the veterinary and sanitary quality parameters despite of the tendency to increase in analyzed parameter content in autumn. The monitoring showed recent decrease in calcium content of cow milk and dairy products intended for infant food. Average calcium content of raw milk was found to be 900–950 mg; it varied from 700 up to 1,100 mg of calcium/litre of milk. Further testing scheme based on analysis of such factors as pure protein, diet, biologically active dietary supplements is proposed. Such testing will allow comprehensive assessment of exogenous factors influencing calcium content of milk as well as harmonization of Russian requirements for food quality and safety assessment with the European ones.

Key words: milk and dairy products, monitoring, veterinary and sanitary quality assessments, calcium content of milk.

ВВЕДЕНИЕ

Государственная политика Российской Федерации направлена на сохранение здоровья и увеличение продолжительности жизни населения страны [6]. В рационе питания особое место занимают молоко и молочная продукция, традиционно являющиеся наиболее ценными и сбалансированными в пищевом и биологическом отношении продуктами питания. В 2016 г. Россия заняла 5-е место в мире по объемам производства молока. На долю РФ приходится 6,2% мирового производства коровьего молока. Только за последние 4 года экспорт в Китай увеличился в 42 раза, а поставки в другие страны выросли на 38%, что говорит о большом потенциале российской молочной отрасли на мировом рынке [8].

Федеральный закон «О техническом регулировании» от 27.12.2002 № 184-ФЗ установил единые требования к продукции, обязательные для применения к объектам технического регулирования. Это свидетельствует о приведении в нашей стране национальных стандартов и других нормативных документов в соответствие с требованиями Всемирной торговой организации [5]. В условиях функционирования России в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) качество и безопасность молока-сырья и молочной продукции определены национальными и межгосударственными стандартами и регулируются техническими регламентами Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) и «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013), которые направлены на получение молочной продукции по устанавливаемым критериям, гарантирующим качество и безопасность продукции и регламентирующим условия ее получения, транспортировки, переработки, хранения и реализации. В качестве национального стандарта Российской Федерации основные требования, предъявляемые к качеству заготавливаемого молока, определены ГОСТ Р 52054-2003 (с изменениями № 1 и 2), а также межгосударственным ГОСТ 31449-2013 [2, 3].

Нарушение ветеринарно-санитарных правил и технологий получения, переработки и хранения молока и молочных продуктов может стать причиной пищевых токсикозов, возникновения вспышек токсикоинфекций, зооантропонозных болезней и т. д. [1]. В связи с этим к молоку-сырью и продукции, поступающим на рынки России, предъявляются требования по критериям оценки качества и безопасности продуктов, установленные ветеринарным законодательством и санитарными правилами [7, 9, 10]. Поэтому постоянная объективная оценка качества и безопасности молока необходима для актуализации существующих на сегодняшний день требований к качеству молока.

Качество молока зависит от ряда экзогенных и эндогенных факторов, таких как вид и порода животного, возраст, стадия лактации, условия кормления и содержания, состояние здоровья и др. Основными ключевыми параметрами натуральности и качества молока-сырья являются содержание в нем белка и жира, казеина, сумма сывороточных белков, кислотности, плотности, показатель точки замерзания молока и др.

На сегодняшний день для потребителей при покупке молочных продуктов, особенно для детского питания, важным показателем является содержание кальция в молоке и продуктах из него. Кальций необходим для протекания множества пластических обменных процессов и находится в молоке в легкоусвояемой и сбалансированной с фосфором форме. Поэтому сни-

жение его содержания в молоке создает предпосылки для недостаточного удовлетворения потребности организма в этом микроэлементе и влияет на метаболизм человека, особенно детей. В этой связи весьма актуальной является оптимизация содержания кальция в сыром молоке, в том числе за счет его повышения путем современных технологических приемов воздействия на направленное изменение метаболизма организма животного, например, с использованием биологически активных кормовых добавок.

Решением проблемы качества сырого молока в последние годы занимаются специалисты разного научно-практического профиля. Исследования таких ученых, как В. М. Карташова, Л. Д. Демидова, Г. А. Таланов, Г. А. Ларионов и др., посвящены вопросам повышения ветеринарно-санитарной безопасности и технологического качества молока. В связи с тем, что одно из первых мест в рамках системы, обеспечивающей получение высококачественного продукта животного происхождения, принадлежит фактору кормления, вопросы использования новых биологически активных компонентов представлены в исследованиях различных ученых, например М. М. Андреева, В. Карпова, В. Касалапова, В. А. Медведского и др.

В условиях интенсивной технологии получения молока существенное значение приобретают мероприятия, позволяющие нормализовать обменные процессы в организме крупного рогатого скота. В целях увеличения молочной продуктивности, жирности молока, его насыщенности витаминами, микроэлементами и другими питательными веществами рядом исследователей, таких как А. В. Востроилов, С. Н. Семёнов, М. А. Кустов, В. И. Трухачев и др., разработаны легкоусвояемые корма и кормовые добавки природного происхождения.

Однако в настоящее время представлено незначительное количество литературных данных, рассматривающих снижение содержания кальция в молоке здоровых животных под влиянием различных факторов. Отсутствуют научно обоснованные и экспериментально доказанные последствия недостатка содержания кальция в молоке-сырье для организма человека. В связи с вышеизложенным, более детальное исследование снижения содержания кальция через рассмотрение факторов, влияющих на ветеринарно-санитарное качество молока коров, определяет актуальность данного исследования.

Целью настоящего исследования является мониторинг содержания кальция в молоке коров под действием эндогенных и экзогенных факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе кафедр паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы и микробиологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина и сторонними аккредитованными лабораториями и центрами.

Объектом исследования являлось сырое молоко клинически здоровых высокопродуктивных коров голштинской и черно-пестрой породы.

Проведены лабораторные исследования 400 образцов молока, полученных из 40 животноводческих хозяйств Московской области в 2001–2017 гг. Изучены органолептические, физико-химические и микробиологические показатели качества сырого молока.

Ветеринарно-санитарные показатели качества и безопасности молока определяли в соответствии с техническими регламентами Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) и «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) [9, 10].

Физико-химические исследования молока проводились согласно ГОСТ Р 52054-2003 [3]. Определение солей кальция в молоке проводили по ГОСТ Р 55331-2012 [4].

Анализ данных, полученных в рамках исследования, основывался на описательной статистике, при которой были определены среднее арифметическое, ошибка среднего, стандартное отклонение. Изменчивость изучаемых характеристик была описана с минимальными и максимальными значениями и отношением стандартного отклонения к среднему арифметическому значению в процентах (коэффициент вариации (V , %)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Преимуществом физиологической ценности молока в питании человека является его сбалансированный состав не только по основным биохимическим компонентам, но и по содержанию минеральных компонентов, в том числе кальция. Роль кальция в организме огромна: он необходим для обеспечения деятельности сердца, входит в состав крови; участвует в пластических и обменных процессах, в формировании костной ткани; входит в состав клеточных структур; является компонентом системы поддержания кислотно-щелочного равновесия внутренней среды организма и нормального функционирования многих жизненно важных систем. Он стабилизирует защит-

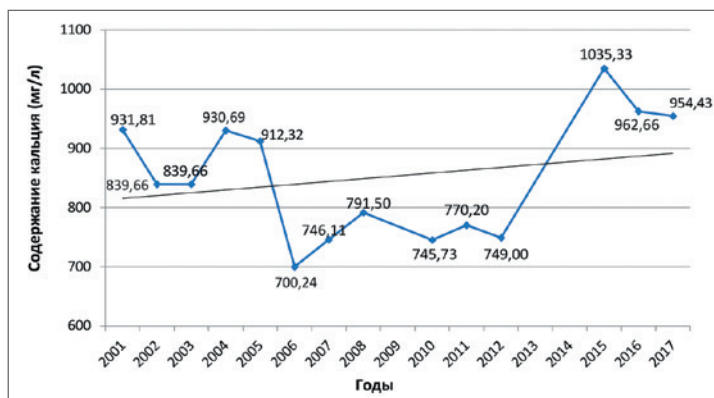


Рис. Мониторинг содержания кальция в сыром молоке коров

ные механизмы, повышающие устойчивость организма к болезням и действию внешних неблагоприятных факторов.

Проведенный в 2001–2017 гг. мониторинг показал, что в последнее время наблюдается тенденция к снижению содержания кальция в молоке коров, в частности, в молочных продуктах, предназначенных для детского питания. Среднее содержание кальция, а также минимальные и максимальные его концентрации в сыром молоке за анализируемый период представлены в таблице 1.

Было установлено, что среднее значение содержания кальция в сыром молоке находится на уровне 900–950 мг, а диапазон колебаний составляет от 700 до 1100 мг кальция в 1 л молока. Несмотря на то, что линия

Таблица 1
Содержание кальция в сыром молоке коров

Год	Ca (мг/л)		
	среднее значение	min	max
2001	931,81 ($\pm 86,69$)	462,9	1208,2
2002	839,66 ($\pm 96,68$)	645,6	1067,0
2003	839,66 ($\pm 163,47$)	466,0	1083,8
2004	930,69 ($\pm 88,54$)	681,2	1134,0
2005	912,32 ($\pm 68,81$)	702,0	1102,0
2006	700,24 ($\pm 64,68$)	572,0	806,0
2007	746,11 ($\pm 97,03$)	564,0	1044,0
2008	791,50 ($\pm 58,89$)	678,0	870,0
2010	745,73 ($\pm 34,33$)	618,0	840,0
2011	770,20 ($\pm 79,77$)	558,0	866,0
2012	749,00 ($\pm 26,87$)	730,0	768,0
2015	1035,33 ($\pm 14,62$)	1016,0	1050,0
2016	962,66 ($\pm 58,51$)	829,9	1048,7
2017	954,43 ($\pm 43,51$)	760,0	1160,0

Таблица 2
Содержание кальция в сыром молоке в зависимости от сезона года

Год	Са (мг/л)			
	Весна	Лето	Осень	Зима
2001	1030,05 ($\pm 66,47$)	969,65 ($\pm 66,75$)	566,11 ($\pm 101,49$)	992,87 ($\pm 86,69$)
2002	963,38 ($\pm 68,64$)	–	860,60 ($\pm 67,47$)	779,08 ($\pm 77,24$)
2003	695,91 ($\pm 47,78$)	628,94 ($\pm 81,14$)	932,24 ($\pm 82,87$)	916,23 ($\pm 145,89$)
2004	769,08 ($\pm 54,65$)	939,21 ($\pm 83,46$)	948,22 ($\pm 77,51$)	945,20 ($\pm 54,55$)
2005	914,91 ($\pm 65,57$)	–	955,00 ($\pm 131,14$)	805,00 ($\pm 69,16$)
2006	693,75 ($\pm 68,88$)	715,33 ($\pm 62,25$)	–	713,33 ($\pm 49,57$)
2007	698,88 ($\pm 53,06$)	–	–	761,26 ($\pm 103,15$)
2008	–	–	–	791,50 ($\pm 58,89$)
2010	840,00 (0)	703,71 ($\pm 19,34$)	–	693,50 ($\pm 52,67$)
2011	732,70 ($\pm 82,99$)	–	808,91 ($\pm 59,74$)	769,00 ($\pm 15,56$)
2012	749,00 ($\pm 26,87$)	–	–	–
2015	–	–	–	1035,33 ($\pm 14,62$)
2016	–	961,05 ($\pm 56,72$)	964,28 ($\pm 61,41$)	–
2017	913,30 ($\pm 38,6$)	940,00 ($\pm 42,70$)	1010,00 ($\pm 34,9$)	–
Среднее	818,27 (120,01)	836,84 (147,14)	874,42 (141,91)	836,57 (115,89)

тренда, представленная на рисунке, отражает тенденцию к повышению средних значений анализируемого показателя, следует заключить, что содержание кальция в сыром молоке не соответствует ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 033/2013 [9, 10].

В связи с этим были проведены исследования по выявлению причин и факторов, влияющих на изменение содержания кальция в молоке-сырье. Одним из этапов исследования являлось изучение влияния сезона года на содержание кальция в молоке-сырье. Полученные за анализируемый период данные представлены в таблице 2.

Несмотря на то, что за анализируемый период наблюдается значительная вариация стандартного отклонения от среднего значения, выявлена тенденция к повышению содержания кальция в молоке в осенний период. Зависимость содержания кальция от сезона года подтверждается лабораторными исследованиями, проведенными рядом сторонних аккредитованных испытательных центров. Однако средние значения данного показателя находятся на уровне 850–900 мг/л.

В настоящее время на кафедрах проводятся комплексные исследования по выявлению причин и факторов, влияющих на снижение концентрации кальция ниже физиологической нормы.

Одним из направлений исследования является выявление зависимости содержания кальция от истинного белка, основанной на том факте, что около 22% всего количества кальция прочно связано с казеином,

остальной кальций находится в виде фосфатов и цитратов. Другое направление исследований включает анализ содержания кальция в молоке в зависимости от пищевых, кормовых и технических культур, а также биодобавок, используемых для кормления животных. Анализ эндогенных и экзогенных факторов позволит в дальнейшем установить причинно-следственные связи, влияющие на изменение содержания кальция, и проводить комплексную оценку качества молока.

Необходимо отметить, что весьма актуальной и перспективной задачей в современных условиях является разработка новых подходов, направленных на повышение качества молока. Одним из подходов по оптимизации содержания кальция в молочной продукции является производство продуктов, обогащенных кальцийсодержащими органическими и неорганическими добавками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов проведенного мониторинга показал, что в исследуемых образцах, поступивших от производителей молока животноводческих хозяйств Московской области, наблюдается тенденция к снижению содержания кальция в молоке, особенно в молочных продуктах, предназначенных для детского питания. Среднее содержание кальция в сыром молоке в течение анализируемого периода находится на уровне 900–950 мг, а диапазон колебаний составляет от 700 до 1100 мг кальция в 1 л молока. Несмотря на тенден-

цию к повышению, особенно в осенний период, содержание кальция в молоке не отвечает требованиям по критериям оценки качества и безопасности продуктов в соответствии с ветеринарным законодательством и санитарными правилами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровков М. Ф., Фролов В. П., Серко С. А. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства / под ред. проф. М. Ф. Боровкова. – 3-е изд., доп. и перераб. – СПб.: Лань, 2010. – 480 с.
2. ГОСТ 31449-2013. Молоко коровье сырое. Технические условия: межгосударственный стандарт. – М.: Стандартинформ, 2013. – 5 с.
3. ГОСТ Р 52054-2003. Молоко коровье сырое. Технические условия (с изменениями № 1, 2): утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11.08.2017 № 885-ст. – Введ. 01.01.04. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200032024>.
4. ГОСТ Р 55331-2012. Молоко и молочные продукты. Титриметрический метод определения содержания кальция: утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29.11.2012 № 1653-ст. – Введ. 01.01.14. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200097842>.
5. О техническом регулировании: Федеральный закон РФ от 27.12.2002 № 184-ФЗ (с изменениями от 29.07.2017) // Российская газета. – 2002. – № 245 (31 декабря).
6. Послание Президента Федеральному Собранию. – URL: <http://www.kremlin.ru/events/president/news/53379> (дата обращения: 11.12.17).
7. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (с изменениями на 6 июля 2011 г.): утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2001. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> (дата обращения: 05.10.17).
8. Союзмолоко выступил с докладом на молочной конференции World Food-2017. – URL: http://www.souzmoloko.ru/news/news_4085.html (дата обращения: 05.12.17).
9. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции: утв. решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 880. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902320560>.
10. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013. О безопасности молока и молочной продукции: утв. решением Совета Евразийской экономической комиссии от 09.10.2013 № 67. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/499050562>.

REFERENCES

1. Borovkov M. F., Frolov V. P., Serko S. A. Veterinary and sanitary examination and basic animal product technology and standardization principles [Veterinarno-sanitarnaya ehkspertiza s osnovami tekhnologii

i standartizacii produktov zhivotnovodstva]. ed. by Prof. M. V. Borovkova. – 3rd revised and updated edition. SPb.: Lan', 2010 (in Russian).

2. GOST 31449-2013. Raw cow's milk. Specifications: international standard [Moloko korov'e syroe. Tekhnicheskie usloviya: mezghosudarstvennyj standart]. M.: Standartinform, 2013 (in Russian).

3. GOST R 52054-2003. Raw cow's milk. Specifications (amended No. 1, 2): approved by the Order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology No. 885-st of August 11, 2017 [Moloko korov'e syroe. Tekhnicheskie usloviya (s izmeneniyami № 1, 2): utv. Prikazom Federal'nogo agentstva po tekhnicheskemu regulirovaniyu i metrologii ot 11.08.2017 № 885-st]. Enacted on January 1, 2004. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200032024> (in Russian).

4. GOST R 55331-2012. Milk and dairy products. Titrimetric method of calcium content determination: approved by the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology: approved by the Order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology No. 1653-st. of November 29, 2012 [Moloko i molochnye produkty. Titrimetricheskij metod opredeleniya sodержaniya kal'ciya: utv. Prikazom Federal'nogo agentstva po tekhnicheskemu regulirovaniyu i metrologii ot 29.11.2012 № 1653-st]. Enacted on January 1, 2014. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200097842> (in Russian).

5. On Technical Regulation. RF Federal Law No. 184-FZ of December 12, 2002 [O tekhnicheskom regulirovanii: Federal'nyj zakon RF ot 27.12.2002 № 184-FZ] (as amended on July 29, 2017). Rossiyskaya gazeta. 2002; 245 (December 31) (in Russian).

6. RF President Address to the Federal Assembly [Poslanie Prezidenta Federal'nomu Sobraniyu]. URL: <http://www.kremlin.ru/events/president/news/53379> (access date: 11.12.17) (in Russian).

7. SanPiN 2.3.2.1078-01. Hygiene requirements for safety and nutrition value of foodstuff (as amended on July 6, 2011): approved by Chief Medical Officer of the Russian Federation on November 6, 2001 [SanPiN 2.3.2.1078-01. Gigienicheskie trebovaniya bezopasnosti i pishchevoj cennosti pishchevyh produktov (s izmeneniyami na 6 iyulya 2011 g.): utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 06.11.2001]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> (access date: 05.10.17) (in Russian).

8. National Dairy Producers Union (Soyzmoloko) made a presentation at Dairy Production Conference within the World Food-2017 [Soyuzmoloko vystupil s докладом на молочной конференции World Food-2017]. URL: http://www.souzmoloko.ru/news/news_4085.html (access date: 05.12.17) (in Russian).

9. Technical Regulation of the Customs Union TR CU 021/2011 on food product safety: approved by the Customs Union Commission Decision No. 880 of December 9, 2011 [Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza TR TS 021/2011. O bezopasnosti pishchevoj produkcii: utv. resheniem Komissii Tamozhennogo soyuza ot 09.12.2011 № 880]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/902320560> (in Russian).

10. Technical Regulation of the Customs Union TR CU 033/2013 on safety of milk and dairy products: approved by the Eurasian Economic Commission Board Decision No. 67 of October 9, 2013 [Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza TR TS 033/2013. O bezopasnosti moloka i molochnoj produkcii: utv. resheniem Soveta Evrazijskoj ehkonomicheskoy komisii ot 09.10.2013 № 67]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/499050562> (in Russian).

Поступила 24.09.18
Принята в печать 20.12.18

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

Д. В. Гадзевич¹, С. И. Данильченко², С. Г. Ерофеев³, М. А. Пасункина⁴, А. Б. Гринченко⁵, В. Н. Ирза⁶, М. С. Волков⁷, А. В. Варкентин⁸

¹ Ведущий ветеринарный врач, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия, e-mail: gadzevich@arriah.ru

² Руководитель ЛДЦ, кандидат ветеринарных наук, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия, e-mail: danylchenko@arriah.ru

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

⁴ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия, e-mail: pasunkina@arriah.ru

⁵ Старший научный сотрудник, ГБУ РК «Ялтинский горно-лесной природный заповедник», г. Ялта, Россия

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

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

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

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты мониторинговых исследований, проведенных в филиале ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018 г. с целью выявления циркуляции вируса гриппа птиц на территории Республики Крым. Поскольку вирусы гриппа птиц чаще всего выявляют у водоплавающих и околоводных видов, наибольшую угрозу заноса и распространения заболевания представляет дикая водоплавающая птица. Поэтому особое внимание уделено акватории Азовского моря и залива Сиваш, описано состояние природных биотопов Центрального и Восточного Сиваша. Во время экспедиций в места скопления дикой водоплавающей птицы проводили отбор проб биологического материала, осуществляли идентификацию видов птиц и производили подсчет численности орнитофауны на данной территории. При лабораторном исследовании методом ПЦР биологического материала, отобранного во время экспедиций, а также от отстрелянных диких птиц, сельско-

хозяйственных птиц, геном вируса гриппа птиц типа А не выявлен. Вследствие уменьшения численности диких водоплавающих птиц в местах их традиционно-го скопления из-за прекращения поступления пресной воды по Северо-Крымскому каналу, можно сделать предположение, что Крымскому полуострову удастся сохранить эпизоотическое благополучие по высокопатогенному гриппу птиц, несмотря на то, что заболевание регистрируют в непосредственной близости от полуострова. Тем не менее угроза интродукции вируса в стада промышленного и приусадебного производства сохраняется в связи с расположением полуострова на пути миграции перелетных птиц, поэтому эпизоотологический мониторинг гриппа птиц является актуальной задачей.

Ключевые слова: дикая водоплавающая птица, грипп птиц, залив Сиваш, миграция, орнитофауна, эпизоотологический мониторинг.

UDC 619:616.98:578.832.1:636.5:639.127:616-036.22

EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF AVIAN INFLUENZA IN THE REPUBLIC OF CRIMEA

D. V. Gadzevich¹, S. I. Danilchenko², S. G. Yerofeyev³, M. A. Pasunkina⁴, A. B. Grinchenko⁵, V. N. Irza⁶, M. S. Volkov⁷, A. V. Varkentin⁸

¹ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol, Russia, e-mail: gadzevich@arriah.ru

² Head of the LDC, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol, Russia, e-mail: danylchenko@arriah.ru

³ Head of the Sector, Candidate of Science (Veterinary medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: erofeev@arriah.ru

⁴ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol, Russia, e-mail: pasunkina@arriah.ru

⁵ Leading Researcher, GBU RK "Yalta Mountain – Forest Nature Reserve", Yalta, Russia

⁶ Chief Expert, Doctor of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: irza@arriah.ru

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

⁸ Head of the Sector, Candidate of Science, Veterinary Medicine, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: varkentin@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents the results of monitoring tests performed in the FGBI "ARRIAH" Branch in 2018 to detect AIV circulation in the Republic of Crimea. As AIVs are most frequently detected in aquatic and semiaquatic birds wild waterfowl present the greatest threat of the disease introduction and spread. That's why the paper gives special attention to the Azov Sea and Sivash water area and describes natural biotopes of the Central and Eastern Sivash. During expeditions biological material samples were collected, bird species were identified and bird fauna was estimated in waterfowl aggregation sites. Laboratory PCR tests of the biological material collected during the expedition as well from killed birds and poultry

revealed no AIV type A. As the number of wildfowl in their usual aggregation sites decreased due to the fact that fresh water supply through the North-Crimean Canal ceased it can be assumed that the Crimean peninsula will manage to maintain HPAI freedom despite the fact that the disease is being reported close to the peninsula. Nevertheless, the threat of the virus introduction to the commercial and backyard farm stocks still exists as the peninsula is located in the bird migration routes and AI epidemics monitoring is a topical task.

Key words: wild waterfowl, avian influenza, Sivash, migration, bird fauna, epidemiological monitoring.

ВВЕДЕНИЕ

Через территорию Крыма проходят миграционные пути перелетных птиц. Азово-Черноморский бассейн, особенно плавни залива Сиваш и побережье Азовского моря, является местом остановок и зимовок этих птиц, которые могут быть природным резервуаром вирусов гриппа [3, 8, 9]. Эпизоотологический мониторинг позволяет отслеживать и контролировать распространение вируса гриппа птиц и своевременно проводить эффективные профилактические мероприятия [2, 3, 5, 7].

Одной из эпизоотологических особенностей вспышек гриппа птиц, регистрировавшихся на территории Крыма в 2005–2008 гг., была сезонность заболевания, возникшего преимущественно зимой. Резкое снижение температуры окружающей среды заставляло диких птиц кочевать в поисках пищи в ближайшие населенные пункты, а иногда и на более дальние расстояния. Во время таких миграций происходил контакт с домашней птицей, содержащейся в личных подсобных хозяйствах граждан (ЛПХ) [1, 3, 4, 8, 10]. В 62% случаев заболевание регистрировали в районах, граничащих с заливом Сиваш (восточная часть), в 23% случаев – на территориях, омываемых Черным морем (городской округ Феодосия, Черноморский и Краснопереконский районы), и в 15% – на территории Центрального Крыма (Симферопольский, Белогорский и Красногвардейский районы) [3, 5, 8].

Целью работы было проведение мониторинга для установления эпизоотической ситуации по гриппу птиц, в первую очередь в регионах, которые по ландшафтно-географическим особенностям являются зоной риска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал от диких птиц отбирали во время экспедиций к побережью Азовского моря и заливу Сиваш совместно с сотрудниками Управления Россельхознадзора по Республике Крым и городу Севастополь и ГБУ РК «Ялтинский горно-лесной природный заповедник». Также в лабораторию филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» для исследования доставлялись пробы биоматериала, отобранные от диких птиц, отстрелянных в различных охотничьих угодьях Крыма; материал от домашних птиц, содержащихся на птицефабриках и в ЛПХ граждан, и пробы продуктов животного происхождения из других регионов (мясо индейки).

При отборе образцов проводили идентификацию диких птиц с использованием атласов-определителей. В ходе экспедиций изучали состояние природных биотопов Центрального и Восточного Сиваша, производили подсчет численности орнитофауны на данной территории. Лабораторные исследования проводили при помощи коммерческих тест-систем российского производства в соответствии с Ветеринарными правилами лабораторной диагностики гриппа А птиц, утвержденными приказом Минсельхоза России № 105 от 3 апреля 2006 г.

В качестве материала использовали:

1. Пробы помета и внутренние органы от перелетных птиц: болотных луней (*Circus aeruginosus*), гравилов (*Limicola falcinellus*), журавлей (*Grus*), красногловых нырков (*Aythya ferina*), краснозобиков (*Calidris ferruginea*), кроншнепов (*Numenius*), крякв (*Anas platyrhynchos*), куликов (*Charadrii*), лебедей-шипунов (*Cygnus olor*), лысух (*Fulica atra*), малых крачек (*Sternula albifrons*), материковых больших бакланов

(*Phalacrocorax carbo*), морских голубков (*Chroicocephalus genei*), морских зуйков (*Charadrius alexandrinus*), обыкновенных квакв (*Nycticorax nycticorax*), пеганок (*Tadorna tadorna*), турухтанов (*Philomachus pugnax*), цапель (*Ardea*), чаек-хохотуний (*Larus cachinnans*), чайконосых крачек (*Gelochelidon nilotica*), черношейных поганок (*Podiceps nigricollis*), чомг (*Podiceps cristatus*), чернголовых чаек (*Ichthyaetus melanocephalus*), чернозобиков (*Calidris alpina*), чибисов (*Vanellus vanellus*), шилоклювок (*Recurvirostra avosetta*).

2. Внутренние органы от отстрелянных в охотугодьях диких птиц: белолобых гусей (*Anser albifrons*), вальдшнепов (*Scolopax rusticola*), водяных курочек (*Gallinula chloropus*), диких голубей (*Columba livia*), красногловых нырков (*Aythya ferina*), крякв (*Anas platyrhynchos*), куликов (*Charadrii*), лысух (*Fulica atra*), свистушек (*Anas penelope*), серых куропаток (*Perdix perdix*), фазанов (*Phasianus colchicus*), чирков-свистунков (*Anas crecca*), шилохвостов (*Anas acuta*).

3. Клоакальные и/или трахеальные смывы от домашних птиц: кур, индеек, гусей, уток.

Лабораторные исследования проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали тест-систему «ГРИПП» производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, в состав которой входят: наборы реагентов для экстракции РНК «Ампли-Прайм РИБО-сорб», для проведения реакции обратной транскрипции «РевертаL»; реактивы для амплификации кДНК Influenza virus A с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые грипп птиц на территории Крыма был зарегистрирован в 2005 г. в с. Некрасовка Советского района, расположенном в 1 км от залива Сиваш, возле которого отмечалось большое скопление диких птиц. Проведенное в то время эпизоотологическое обследование территории показало, что содержание домашней птицы на подворьях было со свободным доступом к рисовым чекам и прибрежной территории [8]. Во время кормления домашняя птица беспрепятственно контактировала как с синантропной (голуби, вороны, воробы), так и с дикой (гуси, утки, чайки) птицей, а поение осуществлялось из открытых емкостей, находившихся на улице. Вероятнее всего, это привело к возникновению гриппа птиц на территории Крыма и быстрому распространению заболевания по ней. При исследовании биологического материала от павших 30 ноября 2005 г. птиц из с. Некрасовка было установлено, что причиной их гибели стал высокопатогенный грипп (ВГП) типа А подтипа H5N1. А 3 декабря 2005 г. падеж сельскохозяйственной птицы регистрировали уже в трех селах Советского, Джанкойского и Ленинского районов [4, 5, 8]. К концу 2005 г. ВГП распространился на Черноморский и Краснопереконский районы. В начале 2006 г. заболевание было зарегистрировано на птицефабрике в городском округе Феодосия и в ЛПХ граждан в поселке Орджоникидзе г. Феодосии. К концу января 2006 г. эпизоотия охватила Кировский, Белогорский и Симферопольский районы. С марта 2006 г. и до 2008 г. случаев ВГП не выявляли. Новые вспышки гриппа птиц H5N1 регистрировали в январе-феврале 2008 г. на птицефабрике в Красногвардейском районе и в ЛПХ Черноморского района. Также фиксировали единичные случаи

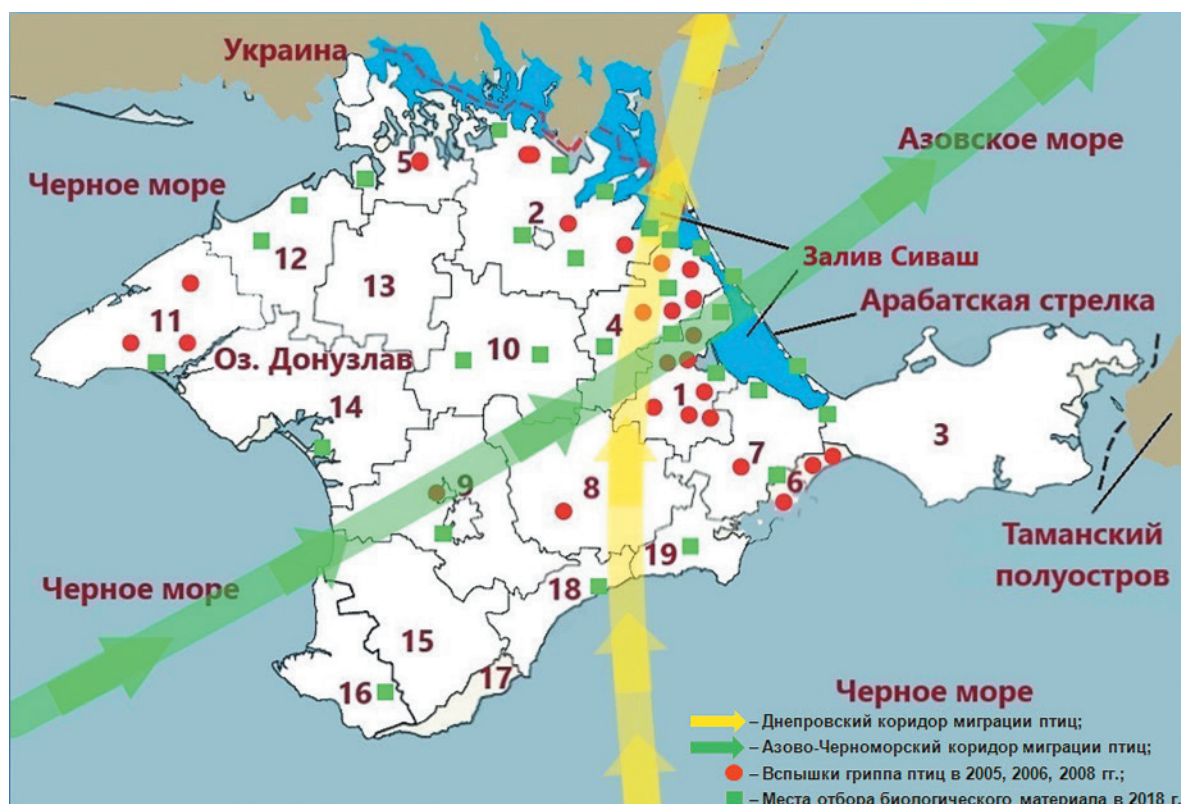


Рис. 1. Миграционные пути перелетной птицы в Республике Крым и вспышки гриппа птиц в 2005–2008 гг. с указанием мест отбора проб биологических/патологических материалов

1 – Советский р-н; 2 – Джанкойский р-н; 3 – Ленинский р-н; 4 – Нижнегорский р-н; 5 – Красноперекопский р-н; 6 – Феодосия; 7 – Кировский р-н; 8 – Белогорский р-н; 9 – Симферопольский р-н; 10 – Красногвардейский р-н; 11 – Черноморский р-н; 12 – Раздольненский р-н; 13 – Первомайский р-н; 14 – Сакский р-н; 15 – Бахчисарайский р-н; 16 – Севастополь; 17 – Ялта; 18 – Алушта; 19 – Судак.

гибели диких птиц, в том числе на территории г. Севастополя. Всего в 2005–2008 гг. в Крыму погибло и было уничтожено 265 110 птиц [1, 5, 6, 8, 11].

Над территорией Крыма проходят значимые миграционные пути – Днепровский (гуси, утки) и Азово-Черноморский (гуси, утки, кулики, лебеди, грачи) коридоры. Они пересекаются над заливом Сиваш, который долгие годы служит кормовой базой, местом гнездования и зимовки для многих видов оседлых, кочующих и перелетных диких птиц. В 2005 г. именно в районах, омываемых заливом Сиваш, были зарегистрированы первые вспышки гриппа птиц. Затем заболевание распространилось вглубь полуострова (рис. 1).

Вирусы гриппа птиц выявляют у целого ряда свободноживущих диких птиц (более 75 видов, принадлежащих к 10 различным отрядам), но чаще всего – именно у водоплавающих и околоводных видов. Около 60% инфицированных вирусом H5N1 видов экологически связаны с водно-болотными угодьями [8, 11], и именно среди представителей этой группы зафиксирована большая часть случаев гибели. Это дает основание полагать, что дикая водоплавающая птица, в том числе обитающая в акватории Сиваша, представляет наибольшую угрозу заноса гриппа птиц в Крым и распространения заболевания по данной территории.

Сиваш представляет собой мелководный залив лагунного типа, в восточной части отделенный от Азовского моря узкой аккумулятивной косой – Арабатской стрелкой. Двумя узкими проливами, ширина которых

составляет от 150 до 200 м, залив соединяется с Азовским морем. На западе Сиваш отделяется от Каркинитского залива Черного моря узким Перекопским перешейком. Акватория залива занимает площадь около 2640 км² и характеризуется довольно сложной конфигурацией береговой линии, длина которой, в зависимости от уровня воды, составляет от 2969 до 3184 км. Наибольшую привлекательность для дикой птицы представляют низкие песчано-илистые солончаковые и заболоченные берега общей протяженностью 2276 км. Они определяют максимальное биологическое разнообразие побережья и в сочетании с кормовыми ресурсами акватории характеризуют Сиваш как крупное водно-болотное угодье, на территории которого отмечается гнездование в общей сложности 132 видов птиц, из них 97 околотовных и 35 сопутствующих видов.

Колониальные поселения голенастых (аистоподобные, *Ciconiiformes*) являются одними из крупнейших в Европе, они формировались в том числе за счет притока птиц с Кубани, днепровских и дунайских поселений. Немалую роль в формировании орнитофауны сыграло опреснение Восточного Сиваша вследствие поступления с 1963 г. большого количества пресной воды по Северо-Крымскому каналу.

Начиная с 2014 г. поступление пресной воды на полуостров Крым по этому каналу было прекращено, что стало причиной быстрой деградации плавневого комплекса и, соответственно, уменьшения состава

и численности орнитофауны данного региона. Во время проведения экспедиций в феврале – июне 2018 г. наблюдавшиеся ранее (в 2016–2017 гг.) колонии гнездящихся птиц уже не встречались. Это дает основание предполагать, что вследствие уменьшения численности диких водоплавающих птиц, особенно в местах их традиционного скопления, Крымскому полуострову удастся сохранить эпизоотическое благополучие по ВГП, несмотря на то, что заболевание регистрируют в непосредственной близости от полуострова. Например, в 2016 г. в Херсонской области Украины регистрировали три очага ВГП, а в 2016–2018 гг. отмечено возникновение ВГП на территории Астраханской, Ростовской областей и Краснодарского края. В 2017 г. в Краснодарском крае у лебедей-шипунов обнаружили вирус высокопатогенного гриппа H5N8 [7, 11]. В июне 2018 г. на территории Симферопольского района имел место случай получения положительного результата на грипп птиц в продукции животного происхождения (мясо индейки), завезенной из Пензенской области.

В Российской Федерации вирус гриппа птиц европейской линии H5N8 клады 2.3.4.4 группы В был впервые обнаружен в конце мая 2016 г. у диких птиц в окрестностях озера Убсу-Нур в Республике Тыва. Затем он получил широкое распространение в России и во многих странах Европы, Африки и Азии [7, 11]. В феврале 2017 г. во время одной из экспедиций на восточном побережье залива Сиваш был обнаружен труп лебедя-шипуна (*Cygnus olor*), в отобранном патологическом материале на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» был выявлен вирус гриппа птиц H5N8 (рис. 2).

В конце 2017 – начале 2018 г. в лабораторию филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» поступила 41 проба биоматериала от отстрелянных диких птиц из семи районов: Джанкойского, Алуштинского, Советского, Нижнегорского, Красногвардейского, Раздольнинского и Кировского. При исследовании методом ПЦР геном вируса гриппа птиц не обнаружен.

В феврале 2018 г. на береговой линии озера Донузлав вблизи с. Медведево Черноморского района был зафиксирован падеж диких водоплавающих птиц. Погибли порядка 1500 голов, преимущественно лысухи (*Fulica atra*) и черношейные поганки (*Podiceps nigricollis*). При исследовании проб патологического материала от павших птиц методом ПЦР в лаборатории филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» геном вируса гриппа птиц выявлен не был.

В июле 2018 г. было отобрано 80 проб биоматериала от домашних птиц из ЛПХ Балаклавского района г. Севастополя, при исследовании которых методом ПЦР геном вируса гриппа птиц также не был обнаружен.

Экспедиции в места скопления дикой водоплавающей птицы на территории Крыма (озера Кучук-Аджиголь, Сасык-Сиваш, Донузлав, залив Сиваш), организованные филиалом ФГБУ «ВНИИЗЖ» совместно с Россельхознадзором и орнитологами, продолжались и в октябре – ноябре 2018 г. (рис. 3). В ходе этих экспедиций был отобран биологический материал (помет) в количестве 54 проб, при исследовании методом ПЦР на грипп птиц типа А получен отрицательный результат.

По состоянию на конец ноября 2018 г. зимовка птиц в Крыму не началась. По результатам неполного учета наблюдались следующие виды птиц: на озере Донузлав: лысуха (*Fulica atra*) – 2000 особей, черношейная поганка (*Podiceps nigricollis*) – 100 особей, большой



Рис. 2. Восточный Сиваш, труп лебедя-шипуна

баклан (*Phalacrocorax carbo*) – 20 особей, озерная чайка (*Chroicocephalus ridibundus*) и чайка-хохотунья (*Larus cachinnans*) – 40 особей, лебедь-шипун (*Cygnus olor*) – 22 особи; на Сиваше (восточная часть): пеганка (*Tadorna tadorna*) – 2000 особей, шилохвость (*Anas acuta*) – 1000 особей, кряква (*Anas platyrhynchos*) – 1000 особей. Красноголовый нырок (*Aythya ferina*) последние два года не зимует на территории Крыма, возможно, по причине отсутствия кормовой базы. На момент наблюдения насчитывалось около 2000 пролетных особей этого вида. При исследовании методом ПЦР семи проб биологического материала от диких птиц: чирка-свистунка (*Anas crecca*), фазана (*Phasianus colchicus*), кряквы (*Anas platyrhynchos*), вальдшнепа (*Scolopax rusticola*), отстрелянных в охотничьих угодьях на территории Белогорского района, – на грипп птиц типа А были получены отрицательные результаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешное развитие птицеводства возможно лишь при стабильном эпизоотическом благополучии. Несмотря на то, что на территории Крыма с 2009 г. по настоящее время не выявлено случаев заболевания и гибели домашних птиц от высокопатогенного гриппа, угроза

Рис. 3. Озеро Сасык-Сиваш, г. Евпатория



интродукции вируса в стада промышленного и приусадебного производства остается высокой. Причиной этому служит расположение полуострова на пути миграции перелетных птиц. Эпизоотологический мониторинг гриппа птиц является актуальной и социально значимой задачей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас вспышек высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации / В. М. Гуленкин, В. Н. Ирза, А. В. Фролов [и др.]. – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2008. – С. 28–33.
2. Белов А. Б. Гипотезы сохранения вирусов гриппа в биосфере и современная эпидемиологическая ситуация в мире // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний: материалы науч.-практ. конф. – Н. Новгород, 2004. – С. 51–57.
3. Дудников С. А., Гуленкин В. М. Концепция природной очаговости и грипп птиц // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2006. – Т. 4. – С. 248–280.
4. Клинические признаки и патологоанатомические изменения при гриппе птиц (H5N1) в Сибирском регионе в 2005 году / А. В. Фролов, А. В. Борисов, В. В. Борисов [и др.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 4. – С. 14–16.
5. Львов Д. К., Ильичев В. Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции (эколого-географические связи птиц с возбудителями инфекции). – М.: Наука, 1979. – 270 с.
6. Обзор ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц субтипа H5 в России в 2016–2017 гг. / В. Ю. Марченко, И. М. Суслопаров, В. Э. Игнатьев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – Вып. 1. – С. 30–35; DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-30-35.
7. Русев И. Т. Роль мигрирующих птиц в заносе и распространении высокопатогенного птичьего гриппа в Украине // Вісник СумДУ. – 2006. – № 8 (92). – С. 29–41.
8. Эпизоотологический мониторинг инфекционных болезней птиц в Республике Крым / Н. Г. Воротилова, С. И. Данильченко, И. Б. Ионкина, Д. В. Гадзевич // Известия сельскохозяйственной науки Тавриды. – 2015. – № 3 (166). – С. 81–92.
9. Вержиховський О. Епізоотична ситуація з високопатогенного грипу птахів в Україні – стан виконання оздоровчих заходів та недопущення поширення збудника // Вет. медицина України. – 2006. – № 3. – С. 14–17.
10. Avian Influenza Portal / OIE. World Organisation for Animal Health. – URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/avian-influenza-portal/>.
11. Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A (H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016 / D. H. Lee, K. Sharshov, D. E. Swayne [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 23 (2). – P. 359–360; DOI: 10.3201/eid2302.161252.

REFERENCES

1. The atlas of highly pathogenic avian influenza outbreaks in the territory of the Russian Federation [Atlas vspyshek vysokopatogennogo gripa ptic na territorii Rossijskoj Federacii]. V. M. Gulenkin, V. N. Irza, A. V. Frolov [et al.]. Vladimir, FGBI "ARRIAH". 2008 (in Russian).
2. Belov A. B. Hypotheses of avian virus persistence in the biosphere and contemporary epidemiological situation in the world [Gipotezy sohraneniya virusov gripa v biosfere i sovremennaya ehpidemiologicheskaya situatsiya v mire]. *Novye tekhnologii v profilaktike, diagnostike, ehpidnadzore i lechenii infekcionnyh zabolevanij: materials of the scientific and practical conference*. N. Novgorod, 2004 (in Russian).
3. Dudnikov S. A., Gulenkin V. M. Concept of the natural nidality and avian influenza [Konceptiya prirodnoj ochagovosti i gripp ptic]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2006; 4: 248–280 (in Russian).
4. Clinical signs and postmortem lesions characteristic of avian influenza (H5N1) in Siberia in 2005 [Klinicheskie priznaki i patologoanatomicheskie izmeneniya pri grippe ptic (N5N1) v Sibirskom regione v 2005 godu]. A. V. Frolov, A. V. Borisov, V. V. Borisov [et al.]. *Vet. medicina Ukraini*. 2006; 4: 14–16 (in Ukrainian).
5. L'vov D. K., Ilyichev V. D. Bird migration and infectious agent transmission [Migracii ptic i perenos vzbuditel' infekcii (ehkologo-geograficheskie svyazi ptic s vzbuditel'nyami infekcii)]. M.: Nauka, 1979 (in Russian).
6. Review of the HPAI subtype 5 situation in Russia in 2016–2017 [Obzor situacii po vysokopatogennomu virusu gripa ptic subtipa H5 v Rossii v 2016–2017 gg.]. V. Yu. Marchenko, I. M. Susloparov, V. E. Ignatyev [et al.]. *Problemy Osobo Opasnykh Infekcii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1: 30–35; DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-30-35 (in Russian).
7. Rusev I. T. Role of migratory birds in the introduction and spread of highly pathogenic avian influenza in Ukraine [Rol' migriruyushchih ptic v zanosе i rasprostraneniі vysokopatogennogo ptich'ego gripa v Ukraine]. *Visnik SumDU*. 2006; 8 (92): 29–41 (in Ukrainian).
8. Epidemiological monitoring of avian infectious diseases in the Republic of Crimea [Epizootologicheskij monitoring infekcionnyh boleznej ptic v Respublike Krym]. N. G. Vorotilova, S. I. Danilchenko, I. B. Ionkina, D. V. Gadzevich. *Izvestiya selskokhozyastvennoy nauki Tavridy*. 2015; 3 (166): 81–92 (in Russian).
9. Вержиховський О. Епізоотична ситуація з високопатогенного грипу птахів в Україні – стан виконання оздоровчих заходів та недопущення поширення збудника [Epizootichna situatsiya z visokopatogennogo gripu ptici v Ukraini – stan vikonannya ozdorovchih zahodiv ta nedopushchennya poshirennya zbudnika]. *Vet. medicina Ukraini*. 2006; 3: 14–17 (in Ukrainian).
10. Avian Influenza Portal. OIE. World Organisation for Animal Health. URL: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/avian-influenza-portal/>.
11. Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A (H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016. D. H. Lee, K. Sharshov, D. E. Swayne [et al.]. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23 (2): 359–360; DOI: 10.3201/eid2302.161252.

Поступила 13.12.18

Принята в печать 31.01.19

ВИДОВОЙ СОСТАВ и СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЭКТОПАРАЗИТОВ ДОМАШНИХ КУР НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

Ч. К. Фома¹, Т. С. Катаева²

¹ Аспирант, ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ (КубГАУ), г. Краснодар, Россия, e-mail: xavierafoma@yahoo.fr

² Профессор, доктор ветеринарных наук, ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ (КубГАУ), г. Краснодар, Россия

РЕЗЮМЕ

Одной из актуальных ветеринарных проблем является инвазированность домашних кур эктопаразитами. Постоянные и временные эктопаразиты являются переносчиками и резервуарами более 100 возбудителей инфекционных болезней птицы, вызывая вспышки различных заболеваний, снижая продуктивность и приводя к увеличению экономических затрат. Представлены результаты изучения фауны основных эктопаразитов домашних кур в частных птицеводческих хозяйствах на территории Краснодарского края. Исследовательскую работу проводили с 2017 по 2018 г. на 600 домашних курах разных пород и возрастов в четырех поселках: Горхуторе (250 кур), Индустриальном (150), Южном (100) и Связисте (100). Результаты проведенного анализа показали, что птицы были заражены следующими эктопаразитами: пухоедами одного вида – *Menopon gallinae* – с наибольшей экстенсивностью инвазии (100%) и средней интенсивностью инвазии – 18,6 экз.; красными куриными клещами *Dermanyssus gallinae* (55,7%) со средней интенсивностью инвазии – 12,5 экз.; зудневыми клещами двух видов – *Knemidocoptes mutans* (17,7%) со средней интенсивностью инвазии – 39,4 экз. и *Knemidocoptes gallinae* (17,7%) со средней интенсивностью инвазии – 35 экз. Сезонная динамика инвазированности птиц эктопаразитами показала, что пухоед *Menopon gallinae* встречался весной, летом и осенью во всех вышеупомянутых хозяйствах. Клещи *Dermanyssus gallinae* чаще встречались весной с максимальной экстенсивностью инвазии (74,4%). Зараженность зудневыми клещами *Knemidocoptes mutans* и *Knemidocoptes gallinae* летом достигала 76%. Результаты исследований свидетельствуют, что зараженность домашних кур различными видами эктопаразитов может быть связана с плохой гигиенической практикой и системой свободного доступа, которые создают для них благоприятную и устойчивую среду. Поэтому необходимо использовать научно обоснованные методы борьбы, включающие современные инсектициды и аппаратуру.

Ключевые слова: эктопаразиты, пухоеды, клещи, куры, сезонная динамика.

UDC 619:616.98:576.89:636.52/.58(470.62)

ECTOPARASITE SPECIES COMPOSITION AND SEASONAL DYNAMICS IN DOMESTIC FOWL IN THE KRASNODAR KRAI

Ch. K. Foma¹, T. S. Katayeva²

¹ Post-Graduate Student, FSBEI HE Kuban SAU, Krasnodar, Russia, e-mail: xavierafoma@yahoo.fr

² Professor, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), FSBEI HE KubSAU, Krasnodar, Russia

SUMMARY

One of the topical veterinary problems is infestation of domesticated chickens with ectoparasites. Permanent and temporary ectoparasites are vectors and reservoirs of more than 100 poultry infectious disease agents; they cause outbreaks of contagious diseases, thus decreasing performance and increasing economic losses. The results of ectoparasite fauna study in domesticated chickens in private backyards of the Krasnodar Krai are given. The research was carried out in 2017–2018 in 600 chickens of different breeds and ages in four settlements: Gorkhutor (250 chickens), Industrialny (150), Yuzhny (100) and Syazist (100). The results of the analysis demonstrated that chickens were infested with the following ectoparasite species: shaft louse *Menopon gallinae* with the highest invasion extensity of 100% and average invasion intensity of 18.6 parasites; poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (55.7%) with average invasion intensity of 12.5 parasites; two species of scaly leg mites – *Knemidocoptes mutans* (17.7%) with average invasion intensity of 39.4 parasites; and *Knemidocoptes gallinae* (17.7%) with average invasion intensity of 35 parasites. Seasonal dynamics of fowl infestation with ectoparasites showed that shaft louse *Menopon gallinae* was found in spring, summer and autumn on all farms. Mites *Dermanyssus gallinae* were found more often in spring with maximum invasion extensity of 74.4%. The prevalence of scaly leg mites *Knemidocoptes mutans* and *Knemidocoptes gallinae* was as high as 76%. The results of the tests indicate that infestation of domesticated chickens with different species of ectoparasites can be linked with bad hygiene practice and free access system, creating favourable and stable environment for them. That is why it is necessary to use scientifically justified control measures, involving modern insecticides and tools.

Key words: ectoparasites, biting lice, mites, chickens, seasonal dynamics.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время птицеводство является интенсивной и динамичной отраслью аграрного сектора, которая обеспечивает население высокоэнергетическими продуктами, содержащими белки, жиры, углеводы [5]. Развитие приусадебного птицеводства требует не меньшего обеспечения ветеринарного благополучия, чем крупные птицефабрики. Одной из важных ветеринарных проблем на сегодня является высокая зараженность домашних кур эктопаразитами [12]. Среди них – широко распространенный на территории Российской Федерации красный куриный клещ *Dermanyssus gallinae* (семейство *Dermanyssidae*), вызывающий дерманиссиоз – инвазионное заболевание домашней, синантропной и дикой птицы. Птицы поражаются независимо от возраста и пола. Заболевание характеризуется острым или хроническим течением. Колонии *Dermanyssus gallinae* регистрируются в помещениях, где содержатся куры, независимо от формы ведения отрасли – промышленной или мелкотоварной. Однако популяции клеща *Dermanyssus gallinae* не редкость в хозяйствах, специализирующихся на выращивании кур и других видов птицы [2, 9].

Паразитирование на птице красного куриного клеща *Dermanyssus gallinae* вызывает чрезвычайное ее беспокойство и появление сопутствующих клинических признаков: анемии, выпадения пера, расклевов, снижения яйценоскости в товарном стаде – от каждой тысячи кур-несушек в среднем недополучено 36 тыс. яиц за год [8]. В достаточно тяжелой форме страдает молодняк, регистрируются случаи гибели цыплят недельного возраста. При слабой и средней интенсивности инвазии куриным клещом яйценоскость снижается на 40%, а при микстинвазии с пухоедами – на 90% [17].

Пухоеды (*Mallophaga*) из семейства *Menoponidae* – одни из самых распространенных постоянных эктопаразитов птицы, инвазированность которыми влечет значительные экономические потери в хозяйствах разных форм собственности [13, 15]. Являясь постоянными наружными паразитами, в процессе своей жизнедеятельности пухоеды наносят большой вред своим хозяевам во время их передвижения и, питаясь частицами эпидермиса и кровью, вызывают раздражение и зуд кожи. Кожные повреждения представляют пути проникновения в организм птицы патогенных микроорганизмов, что приводит к снижению иммунитета организма [4].

Постоянные и временные эктопаразиты являются переносчиками и резервуарами более 100 возбудителей инфекционных болезней птицы [7], таких как спи-

рохетоз, микоплазмоз, орнитоз, чума, сальмонеллез, пастереллез и ряд других, вызывая вспышки указанных болезней и приводя к большим экономическим потерям [1].

Исходя из вышеуказанного, цель работы – изучение фауны эктопаразитов кур в частных птицеводческих хозяйствах на территории Краснодарского края.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовательскую работу проводили в условиях крестьянских фермерских хозяйств в окрестностях города Краснодара с 2017 по 2018 г. Всего было осмотрено 600 домашних кур разных пород и возрастов, находящихся в четырех поселках: Горхуторе – 250 кур, Индустриальном – 150, Южном – 100 и Связисте – 100.

Больных и павших птиц доставляли для исследования в лабораторию кафедры паразитологии, ветсанэкспертизы и зоогигиены (КубГАУ). Их помещали в кюветы и тщательно осматривали на наличие эктопаразитов, начиная с головы, за которой следовали шея, спина, перо крыльев, живот, хвост и лапы. Всех насекомых собирали пинцетом или кисточкой, смоченной в 70%-м спирте, с каждой зараженной части тела хозяина. Собранных эктопаразитов помещали в пробирки и фиксировали в 70-градусном спирте. Для тщательного изучения эктопаразитов готовили временные препараты. Паразитов переносили на предметное стекло в каплю глицерина и накрывали покровным стеклом.

У каждой больной курицы брали скальпелем соскобы с глубоких слоев кожи ног на цевке и пальцах. После приготовления временных препаратов соскоб помещали на предметное стекло, добавляли 40%-й раствор молочной кислоты, через 1–2 ч тщательно расщепляли материал препаративной иглой и извлекали клещей.

Видовую принадлежность эктопаразитов устанавливали измерением их шкалой окуляр-микрометра (7 × 10), используя метод микрометрии [6]. В соответствии с их морфологическими характеристиками проводили идентификацию по классификации Д. И. Благовещенского (1959, 1964) [3, 10].

Все эксперименты на птицах проводили согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2012 г. по охране животных, используемых в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований были обнаружены следующие эктопаразиты: пухоеды семей-

Таблица
Видовой состав эктопаразитов и показатели инвазированности кур в 2017–2018 гг.
(n = 600)

Вид паразита	Инвазировано		ИИ _{min} – ИИ _{max} (ИИ _{ср}), экз.	ИО, экз.
	Кол-во особей	ЭИ, %		
<i>Menopon gallinae</i>	600	100	5–125 (18,6)	18,6
<i>Dermanyssus gallinae</i>	334	55,7	2–78 (12,5)	7
<i>Knemidocoptes mutans</i>	106	17,7	10–150 (39,4)	7
<i>Knemidocoptes gallinae</i>	106	17,7	7–119 (35)	6,2

ства *Menoponidae* вида *Menopon gallinae*; гамазовые клещи семейства *Dermanyssidae* вида *Dermanyssus gallinae*; зудневые клещи семейства *Sarcoptidae* двух видов – *Knemidocoptes mutans* и *Knemidocoptes gallinae*. Разновидность эктопаразитов, экстенсивность (ЭИ) и интенсивность (ИИ) инвазии, индекс обилия (ИО) представлены в таблице.

При исследовании пухоеды *Menopon gallinae* были обнаружены у всех птиц с ЭИ – 100%, ИИ_{min} – 5 экз., ИИ_{max} – 125 экз., ИИ_{cp} – 18,6 экз. и ИО – 18,6 экз. Куриные клещи *Dermanyssus gallinae* были найдены у 334 (55,7%) кур с ИИ_{min} – 2 экз., ИИ_{max} – 78 экз., ИИ_{cp} – 12,5 экз. и ИО – 7 экз. У 106 (17,7%) птиц было выявлено заражение зудневыми клещами *Knemidocoptes mutans* с ИИ_{min} – 10 экз., ИИ_{max} – 150 экз., ИИ_{cp} – 39,4 экз. и ИО – 7 экз. *Knemidocoptes gallinae* присутствовали у 106 (17,7%) кур с ИИ_{min} – 7 экз., ИИ_{max} – 119 экз., ИИ_{cp} – 35 экз. и ИО – 6,2 экз.

Изучение сезонной динамики инвазированности кур эктопаразитами в окрестностях города Краснодара проводили весной, летом и осенью. Установили, что во все перечисленные времена года и во всех хозяйствах *Menopon gallinae* обнаружен у всех птиц с ЭИ – 100%.

В птицеводческих хозяйствах поселка Горхутора максимальная ЭИ (74,4%) *Dermanyssus gallinae* была зарегистрирована весной, минимальная (46,8%) – осенью и 69,9% ЭИ составляла летом. В поселке Индустриальном наибольшая ЭИ (63,3%) была весной, наименьшая (53,3%) – зарегистрирована осенью, а летом – составляла 57,8%. В поселке Южном ЭИ на уровне 42% и 36% была отмечена весной и летом соответственно. В поселке Связисте были заражены весной 38% и летом 54% кур.

Зараженность клещами *Knemidocoptes mutans* зарегистрирована только в поселках Южном и Связисте. В весенний и летний период в поселке Южном были заражены 44% и 76% кур соответственно, а в поселке Связисте – 48% и 44% птиц. Осенью *Knemidocoptes mutans* найден не был.

Чесотка птиц, вызываемая клещами *Knemidocoptes gallinae*, зарегистрирована только в поселках Южном и Связисте. В поселке Южном весной были заражены 44% кур, летом – 76%; в поселке Связисте – весной 48% и летом 44%. Осенью *Knemidocoptes gallinae* не выявляли.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что зараженность домашних кур различными видами эктопаразитов может быть связана с плохой гигиенической практикой и системой свободного доступа, которые создают для них благоприятную и устойчивую среду [14, 16]. Наиболее распространенным видом был пухоед *Menopon gallinae* (100%), который встречался по всему телу птицы, но преимущественно под крыльями, в области груди и бедер. Похожую картину выявил в Дагестане В. Ш. Пашаев в 2009 г., где экстенсивность заражения составляла от 38 до 100% [11].

Красный куриный клещ *Dermanyssus gallinae* выявлен у кур практически из всех обследованных птичников. Наблюдали местное поражение кожи с характерным покраснением, появлением папулезной сыпи и расчесов. Пик паразитирования наблюдался весной. Экстенсивность заражения достигала 74,4%. Клещи в естественных биотопах переживают осенне-зимний период в состоянии «холодового оцепенения». Известно, что *Dermanyssus gallinae* теплолюбивы и гигрофильны. Этим объясняется повышенная активность и бы-

строе развитие клещей в весенний и летний периоды, что ведет к массовому заселению ими птичников [2].

Knemidocoptes mutans и *Knemidocoptes gallinae* паразитировали на оперенных частях ног и под роговыми щитками ног у кур, зараженность клещами птиц составляла 76%. Пик паразитирования приходился на теплый период года. Птица, больная кнемидокоптозом, была малоподвижной, вялой, часто поджимала конечности, плохо поедала корм, испытывала зуд, часто перебирала клювом оперение. Пальцы были деформированы, утолщены и покрыты налетом серо-коричневого цвета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении экспериментальных исследований установлено, что куры в условиях крестьянских фермерских хозяйств в окрестностях города Краснодара заражены различными видами эктопаразитов. Пухоед *Menopon gallinae* (100%) был обнаружен у всех птиц весной, летом и осенью, гамазовый клещ *Dermanyssus gallinae* показал высокую экстенсивность инвазии весной (74,4%), зараженность клещами *Knemidocoptes mutans* и *Knemidocoptes gallinae* достигала 76% в теплый период года. Эктопаразиты, как известно, отрицательно влияют на состояние здоровья птиц и способствуют снижению продуктивности. Поэтому необходимо использовать научно обоснованные методы борьбы, включающие современные инсектициды и аппаратуру.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акбаев Р. М., Василевич Ф. И. К вопросу о способности гамазодных клещей *Dermanyssus gallinae* быть переносчиками возбудителей инфекционных болезней // Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики болезней животных и птиц: сб. науч. трудов, 2010. – № 3. – С. 73–75.
2. Акбаев Р. М. Эктопаразиты птицы на территории птицефабрик промышленного типа Нечерноземной зоны // Ветеринария. – 2009. – № 10. – С. 32–38.
3. Благоевещенский Д. И. Отряд *Mallophaga* – Пухоеды // Определитель насекомых Европейской части СССР: Вып. 5, Т. 1. Низшие, древнекрылые, с неполным превращением / под общ. ред. чл.-кор. АН СССР Г. Я. Бейбиенко. – Л.: Наука. Ленингр. отделение, 1964. – С. 309–323.
4. Богданова А. Н. Популяция пухоедов (*Mallophaga*) на домашних курах в Жирновском районе Волгоградской области // Современные тенденции развития науки и технологий: сб. науч. трудов по материалам II Международной научно-практической конференции 31 мая 2015 г.: в 7 ч. Часть I. – 2015. – № 2–1. – С. 48–51.
5. Галат В. Ф., Евстафьева В. А., Хижня Л. Ю. Особенности морфологического строения возбудителей маллофагозов кур в хозяйствах Полтавской области // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2013. – Т. 49, вып. 2, ч. 1. – С. 47–51.
6. Измерение микроскопических препаратов, методика количественного изучения органов и частей органов / Б. Ромейс // Микроскопическая техника: пер. с нем. / под ред. И. И. Соколова. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1953. – С. 217–220.
7. Козлов В. И. Чернотелка *Alphitobius diaperinus* Panz. как хищник куриного клеща *Dermanyssus gallinae* Redi // Паразитология. – 1970. – Т. 4, № 4. – С. 363–364.
8. Куян Н. В. Как бороться с красным клещом в птичнике // Эффективне птахівництво. – 2006. – № 3. – С. 45–46.
9. Нагорная Л. В. Изучение эпизоотической ситуации относительно эктопаразитов в хозяйствах с разведения суходоль-

ной птицы // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2014. – Т. 50, вып. 2, ч. 1. – С. 103–106.

10. Насекомые пухоеды (*Mallophaga*) / Д. И. Благовещенский // Фауна СССР. – М.; Л.: Издательство АН СССР, 1959. – 202 с.

11. Пашаев В. Ш., Алиев Ш. К. Биологические особенности и динамика активности эктопаразитов домашних и диких птиц Дагестана // Российский паразитологический журнал. – 2009. – № 1. – С. 24–31.

12. Сиренко Е. С., Богач Н. В., Машкей А. Н. Распространение дерманиссиоза и маллофагоза кур в приусадебных хозяйствах // Вестник Курской ГСХА. – 2014. – № 2. – С. 56–58.

13. Фролов Б. А. Эктопаразиты птиц и борьбы с ними. – М.: Колос, 1975. – 128 с.

14. Mirzaei M., Ghashghaei O., Yakhchali M. Prevalence of ectoparasites of indigenous chickens from Dalahu region, Kermanshah province, Iran // *Turkiye Parazit. Derg.* – 2016. – Vol. 40 (1). – P. 13–16; DOI: 10.5152/tpd.2016.4185.

15. Prelezov P. N., Koinarski V. Ts. Species variety and population structure of *Mallophaga* (Insecta: *Phthiraptera*) on chickens in the region of Stara Zagora // *Bulg. J. Vet. Med.* – 2006. – Vol. 9 (3). – P. 193–200.

16. Prevalence of ectoparasites infestation in indigenous free-ranging village chickens in different agro-ecological zones in Kenya / Z. A. Sabuni, P. G. Mbuthia, N. Maingi [et al.] // *Livest. Res. Rural Dev.* – 2010. – Vol. 22 (11): 212. – URL: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd22/11/sabu22212.htm>.

17. Schnieder T. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. – Stuttgart: Parey, 2006. – S. 636–648.

REFERENCES

1. Akbayev R. M., Vasilevich F. I. Discussing the ability of mole mites *Dermanyssus gallinae* to transmit infectious diseases [K voprosu o sposobnosti gamazoidnykh kleshchej *Dermanyssus gallinae* byt' perenoschikami vzbuditelej infekcionnykh boleznej]. *Sovremennye problemy diagnostiki, lecheniya i profilaktiki boleznej zhivotnykh i ptic: proceedings*, 2010; 3: 73–75 (in Russian).

2. Akbayev R. M. Poultry ectoparasites on commercial farms in the Nonchernozem zone [Ekto-parazity pticy na territorii pticefabrik promyshlennogo tipa Nechernozemnoj zony]. *Veterinariya*. 2009; 10: 32–38 (in Russian).

3. Blagoveschensky D. I. Suborder *Mallophaga* – Biting lice. Identification guide of insects in the USSR European part: ed. 5, V. 1. Lower hemimetabolic Palaeoptera [Otryad *Mallophaga* – Puhoedy. Opredelitel' nasekomykh Evropejskoj chasti SSSR: Vyp. 5, T. 1. Nizshie, drevnekrylye, s nepolnym prevrashcheniem. ed. by Corresponding Member of the USSR Academy of Sciences G. Ya. Beybiyenko. L.: Nauka. Leningrad Branch, 1964 (in Russian).

4. Bogdanova A. N. Biting mite population (*Mallophaga*) in domesticated chickens in Zhirnovsky Rayon, Volgograd Oblast [Populyaciya puhoedov (*Mallophaga*) na domashnih kurah v Zhirnovskom rajone Volgogradskoj oblasti]. *Sovremennye tendencii razvitiya nauki i tekhnologii: proceedings of II International scientific and practical conference*, May 31, 2015: 7 parts. Part I. 2015; 2–1: 48–51 (in Russian).

5. Galat V. F., Yevstafieva V. A., Khizhnyia L. Yu. Morphology peculiarities of mallophagosis agents in chickens of Poltava Oblast farms [Osobennosti morfologicheskogo stroeniya vzbuditelej mallofagozov kur v hozyajstvakh Poltavskoj oblasti]. *Uchenye zapiski UO VGAVM*. 2013; 49 (2, 1): 47–51 (in Belarus).

6. Measurements of microscopic preparations; quantification of organs and organ parts [Izmerenie mikroskopicheskikh preparatov, metodika kolichestvennogo izucheniya organov i chastej organov]. B. Romeys. *Mikroskopische Technik*: translated from German. ed. by I. I. Sokolov. M.: Izdatelstvo inostrannoi literatury, 1953 (in Russian).

7. Kozlov V. I. The tenebrionid *Alphitobius diaperinus* Panz., a predator of *Dermanyssus Gallinae* Redi [Chernotelka *Alphitobius diaperinus* Panz. kak hishchnik kurinogo kleshcha *Dermanyssus gallinae* Redi]. *Parazitologiya*. 1970; 4 (4): 363–364 (in Russian).

8. Kuyan N. V. Methods to control red mites in a poultry house [Kak borot'sya s krasnym kleshchom v ptichnike]. *Ефективне птахівництво*. 2006; 3: 45–46 (in Ukraine).

9. Nagornaya L. V. Study of epidemiological situation related to ectoparasites on poultry farms [Izuchenie ehpizooticheskoy situacii odnositel'no ehktoparazitov v hozyajstvakh s razvedeniya suhodol'noj pticy]. *Uchenye zapiski UO VGAVM*. 2014; 50 (2, 1): 103–106 (in Belarus).

10. Biting lice (*Mallophaga*) [Nasekomye puhoedy (*Mallophaga*)]. D. I. Blagoveschensky. *USSR Fauna*. M.; L.: Publishing Office of the USSR Academy of Sciences, 1959 (in Russian).

11. Pashaev V. S., Aliev S. K. Bio-ecological peculiarities and activity dynamics of ectoparasites of domesticated and wild birds in Dagestan [Bioehkologicheskie osobennosti i dinamika aktivnosti ehktoparazitov domashnih i dikih ptic Dagestana]. *Russian Journal of Parasitology*. 2009; 1: 24–31 (in Russian).

12. Sirenko Ye. S., Bogach N. V., Mashkey A. N. Spread of dermanissiosis and mallophagosis in backyard chickens [Rasprostranenie dermanissioza i mallofagoza kur v priusadebnykh hozyajstvakh]. *Vestnik of Kursk State Agricultural Academy*. 2014; 2: 56–58 (in Russian).

13. Frolov B. A. Ectoparasites of birds and their control [Ekto-parazity ptic i bor'by s nimi]. M.: Kolos, 1975 (in Russian).

14. Mirzaei M., Ghashghaei O., Yakhchali M. Prevalence of ectoparasites of indigenous chickens from Dalahu region, Kermanshah province, Iran. *Turkiye Parazit. Derg.* 2016; 40 (1): 13–16; DOI: 10.5152/tpd.2016.4185.

15. Prelezov P. N., Koinarski V. Ts. Species variety and population structure of *Mallophaga* (Insecta: *Phthiraptera*) on chickens in the region of Stara Zagora. *Bulg. J. Vet. Med.* 2006; 9 (3): 193–200.

16. Prevalence of ectoparasites infestation in indigenous free-ranging village chickens in different agro-ecological zones in Kenya. Z. A. Sabuni, P. G. Mbuthia, N. Maingi [et al.]. *Livest. Res. Rural Dev.* 2010; 22 (11): 212. URL: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd22/11/sabu22212.htm>.

17. Schnieder T. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Stuttgart: Parey, 2006.

Поступила 12.01.19
Принята в печать 16.01.19

ВАЛИДАЦИЯ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПОСРЕДОВАННОЙ ОЦЕНКИ ТИТРА ВИРУСА ЯЩУРА

Д. А. Лозовой¹, М. И. Доронин², В. А. Стариков³, Д. В. Михалишин⁴, А. А. Шишкова⁵, А. М. Тимина⁶, А. В. Борисов⁷

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

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

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

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

⁵ Главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shishkova@arriah.ru

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

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

РЕЗЮМЕ

В статье описан процесс валидации методики для опосредованной оценки титра культурального вируса ящура ($T_{\text{ва}}$) в сырье для вакцины методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени на основании установленной величины порогового цикла амплификации (C_t) с применением линейной регрессионной модели $T_{\text{ва}} = -0.2956C_t + 11.4650$. Проведен анализ полученных результатов исследования 390 проб культурального вируса ящура и определены основные валидационные характеристики предложенной методики: специфичность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения, диапазон применения и линейность. Результаты валидации методики для опосредованной оценки титра вируса ящура в ОТ-ПЦР-РВ удовлетворяли критериям приемлемости.

Ключевые слова: ящур, титр инфекционной активности вируса, валидация, ОТ-ПЦР-РВ, пороговый цикл амплификации.

UDC 619:578.835.2:616-076

VALIDATION OF REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION FOR INDIRECT ASSESSMENT OF FMD VIRUS TITRE

D. A. Lozovoy¹, M. I. Doronin², V. A. Starikov³, D. V. Mikhilishin⁴, A. A. Shishkova⁵, A. M. Timina⁶, A. B. Borisov⁷

¹ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: lozovoy@arriah.ru

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

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

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

⁵ Chief Technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: shishkova@arriah.ru

⁶ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: timina@arriah.ru

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

SUMMARY

Procedure for validation of the method for indirect assessment of cultural FMD virus titre (T_{FMDV}) in raw materials used for vaccine production with real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCRrt) based on determined amplification threshold cycle value (C_t) using linear regression model, $T_{\text{FMDV}} = -0.2956C_t + 11.4650$, is described in the paper. Testing results for 390 samples of cultural FMD virus were analyzed and basic validation characteristics of the proposed method: specificity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification, application scope and linearity, were defined. Validation results for the method for indirect assessment of FMD virus titre with RT-PCRrt met the acceptance criteria.

Key words: foot-and-mouth disease (FMD), virus infectivity titre, validation, RT-PCRrt, amplification threshold cycle.

ВВЕДЕНИЕ

Производство вакцин для ветеринарного применения должно полностью гарантировать соответствие выпускаемой продукции своему назначению и предъявляемым к нему требованиям. Для достижения этих целей на предприятиях функционирует система обеспечения качества промежуточного сырья и готовой продукции, которая включает в себя проведение детального контроля всех этапов изготовления вакцины.

В процессе производства противоящурных вакцин важную роль играет аналитический контроль сырья, в частности, определение титра инфекционной активности вируса ящура, репродуцированного в суспензионной перевиваемой культуре клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17). Одним из методов опосредованной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [9, 10], позволяющая определять количество копий генома и полных инфекционных частиц вируса, которые вызывают появление признаков цитопатического действия (ЦПД) в чувствительных культурах клеток [1, 6, 8, 9]. Результаты исследований Ж. А. Шаждо (1980), А. П. Пономарева, М. В. Котовой и соавт. (1983) подтверждают, что за инфекционную активность ответственны преимущественно полные частицы вируса ящура. Известно, что в вирусных суспензиях наряду с инфекционными присутствуют неинфекционные 146S частицы, однако их количество незначительно и составляет примерно 1:10000 [6]. Данные научных публикаций Т. R. Doel (1982), Н. С. Мамкова, В. Л. Узюмова и соавт. (1983), Р. Р. Рюкерта (1989) свидетельствуют о наличии корреляции между количеством 146S частиц вируса ящура и степенью его цитопатогенного действия в зараженной культуре клеток [1, 6]. Изложенные сведения доказывают возможность применения ОТ-ПЦР-РВ для опосредованного определения титра вируса ящура в сырье для вакцины [8].

Оценку пригодности количественного варианта ОТ-ПЦР-РВ с использованием ранее предложенной линейной регрессионной модели: $T_{\text{вн}} = -0,2956Ct + 11,4650$, где $T_{\text{вн}}$ – титр вируса ящура; Ct – пороговый цикл амплификации [8], проводят на основе результатов валидации, предполагающей определение специфичности, правильности, прецизионности, диапазона применения и линейности аналитической методики, а также предела обнаружения и количественного определения анализа [2–4, 9].

В отношении рассматриваемой методики ОТ-ПЦР-РВ под специфичностью понимают способность однозначно количественно определять наличие инфекционных частиц вируса ящура, вызывающих развитие ЦПД в культуре клеток из почки свиньи (IB-RS-2) [4] при наличии в анализируемой пробе посторонних антигенных компонентов.

Получение результатов с высокой степенью достоверности возможно исключительно при использовании точной методики, с помощью которой итоги измерения близки к эталонному значению величины [2]. Точность количественной методики раскрывают понятия правильности и прецизионности. Под правильностью в данном случае рассматривают близость среднего значения титра вируса ящура, полученного на основании большой серии экспериментов, к эталонному значению. Под прецизионностью предложенной методики понимают степень разброса результатов из-

мерений пороговых циклов амплификации между сериями измерений, проведенных для множества проб, которые взяты из одного и того же образца в условиях, регламентированных методикой [2, 7]. Для оценки уровня достижения необходимого качества результатов проводят анализ повторяемости в условиях сходимости и воспроизводимости, определяя абсолютные и относительные показатели вариации [2, 3, 7, 11, 12].

Пределом обнаружения рассматриваемой аналитической методики считают наименьшее количество инфекционных частиц вируса ящура в пробе, вызывающих развитие ЦПД, которое может быть обнаружено, но не обязательно определено количественно [5, 7]. Пределом количественного определения в данном случае является наименьшее значение титра вируса ящура, которое можно количественно определить с соответствующей правильностью и прецизионностью методики [2].

Показателем того, что существует прямо пропорциональная зависимость значений порогового цикла амплификации и титра вируса ящура в пределах аналитической области методики, является ее линейность [2, 7, 11]. Диапазоном применения разработанной методики считают интервал между наибольшим и наименьшим значениями титра вируса, в котором предложенный алгоритм определения анализа имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности [2, 12].

Цель исследований – оценка пригодности методики опосредованной оценки титра инфекционной активности культурального вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый материал. В работе использовали культуральный вирус ящура вакцинных штаммов: А № 2187/Кути/2013, А № 2029/Турция/2006, А № 2171/Кабардино-Балкарский/2013, О № 2212/Приморский/2014, О № 2047/08/Саудовская Аравия 120/29, О₁ № 1618/Чечено-Ингушский/66, Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011, Азия-1 № 1946/Шамир Израиль 3/89, САТ-2/Кения 183/74, САТ-2/Саудовская Аравия/2000, репродукцию которых осуществляли в суспензионной перевиваемой культуре клеток ВНК-21/2-17.

Обратно-транскриптная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Постановку анализа проводили, как описано А. П. Пономаревым и соавт. [6]. Результаты ОТ-ПЦР-РВ представляли в виде расчетных значений титра. Расчетным титром вируса считали значение, полученное при анализе порогового цикла амплификации для отобранных проб относительно калибровочных проб вируса ящура с известным титром. Для построения калибровочных графиков применяли функцию «Количественный анализ» программного обеспечения амплификатора Rotor-Gene 6000 Series Software v. 1.8.17.5.

Титрование вируса ящура в чувствительной клеточной линии. Для определения титра инфекционной активности ($Ig\ TCD_{50}/cm^3$) вакцинных штаммов культурального вируса ящура применяли перевиваемую монослойную культуру клеток IB-RS-2 [4].

Оценка специфичности методики. Специфичность методики оценивали по относительной погрешности (е) результатов, полученных одновременно с использованием валидируемой методики ОТ-ПЦР-РВ [6] и титро-

ванием вируса в культуре клеток IB-RS-2 [4]. Проводили исследование 10 модельных смесей культурального вируса ящура, которые содержали разное количество инфекционных частиц, вызывающих развитие ЦПД в клеточной линии IB-RS-2, в смеси с 75S, 12S и 3,8S компонентами, которые не оказывают подобного эффекта на клетки [1, 4, 9]. Фракционирование культурального вируса ящура на компоненты осуществляли с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [9]. Анализ выполняли в 6 повторностях. Относительную погрешность находили по формуле: $e = (T_{\text{вв}}^1 - T_{\text{вв}}^2) / T_{\text{вв}}^1$, где $T_{\text{вв}}^1$ – титр вируса по результатам ОТ-ПЦР-РВ; $T_{\text{вв}}^2$ – титр вируса по итогам титрования в культуре клеток IB-RS-2.

Специфичность методики считали высокой при $e \leq 5\%$ [7, 11].

Оценка правильности методики. Для определения правильности методики проводили анализ 390 проб культурального вируса ящура с известными значениями титра, осуществляя постановку количественного варианта ОТ-ПЦР-РВ. Данные были представлены в виде уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными в ОТ-ПЦР-РВ (y) и эталонными значениями титра вируса (x): $y = k \times x + b$. Для полученной функции проверяли гипотезы о равенстве тангенса угла наклона (k) единице и равенстве свободного члена (b) нулю. При доказательстве верности указанных гипотез со степенью надежности, равной 0,05, использование валидируемой методики дает свободные от ошибки результаты [2, 5, 7, 12].

Анализ прецизионности методики. Для оценки прецизионности предложенной методики ОТ-ПЦР-РВ в условиях сходимости и воспроизводимости рассчитывали абсолютные и относительные показатели вариации.

Определение абсолютных показателей вариации. Размах вариации (R) определяли как разность между наибольшим и наименьшим значениями порогового цикла амплификации: $R = Ct_{\text{max}} - Ct_{\text{min}}$. Индивидуальное линейное отклонение (d_i) находили по формуле: $d_i = |Ct_i - Ct_{\text{cp}}|$. Среднее линейное отклонение (d_{cp}) рассчитывали как среднее арифметическое из индивидуальных линейных отклонений: $d_{\text{cp}} = \sum |d_i| / N$, где d_i – индивидуальные линейные отклонения пороговых циклов амплификации; N – объем совокупности. Оценку дисперсии (δ^2) показателей проводили с использованием формулы: $\delta^2 = (\sum d_i^2) / N$. Для характеристики размеров вариации Ct рассчитывали среднее квадратичное отклонение (δ), пользуясь формулой: $\delta = \sqrt{\delta^2}$ [2].

Определение относительных показателей вариации. Расчет коэффициента осцилляции (V_R) проводили, пользуясь формулой: $V_R = R / Ct_{\text{cp}} \times 100$. Линейный коэффициент вариации (C_d) рассчитывали по формуле: $C_d = d_{\text{cp}} / Ct_{\text{cp}} \times 100$. Для оценки колеблемости индивидуальных значений пороговых циклов амплификации определяли коэффициент вариации (C_δ) по формуле: $C_\delta = \delta / Ct_{\text{cp}} \times 100$ [2]. Метод считают надежным при $C_\delta < 2\%$ в условиях сходимости и $C_\delta < 3\%$ в условиях воспроизводимости [2, 7].

Расчет предела обнаружения титра вируса ящура ($ПО_{\text{твв}}$). Наименьшее количество инфекционных частиц вируса ящура с использованием валидируемой методики находили по формуле: $ПО_{\text{твв}} = 3,3 \times S_b / k$, где S_b – стандартное отклонение аналитического сигнала, которое соответствует стандартному отклонению свободного члена (b); k – тангенс угла наклона [5, 7].

Свободный член b находили при анализе 10 модельных образцов с титрами вируса ящура: 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 7,50; 8,00; 9,00 $\lg$ ТЦД₅₀/см³.

Вычисление предела количественного определения титра вируса ящура ($ПКО_{\text{твв}}$). Минимальное значение титра вируса ящура, определенное с соответствующей правильностью и прецизионностью валидируемой методики, рассчитывали, применяя формулу: $ПКО_{\text{твв}} = 10 \times S_b / k$ [7, 11]. Полученное значение $ПКО_{\text{твв}}$ подтверждали прямым экспериментом при исследовании 13 модельных суспензий культурального вируса с титрами, близкими к найденному значению предела количественного определения. Анализ проводили в 5 повторениях. Результаты исследования считали достоверными при $p < 0,005$.

Определение диапазона применения методики. Для оценки аналитической области валидируемой методики исследовали 11 модельных образцов со следующими значениями титра вируса ящура: 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 9,50 $\lg$ ТЦД₅₀/см³ в 5 повторениях.

Оценка линейности методики. Существование линейной зависимости порогового цикла амплификации и титра вируса ящура в пределах диапазона применения методики проверяли в ходе эксперимента, определяя Ct для 40 проб с различными количествами аналита в 5 повторениях. Полученные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием регрессии вида: $Ct = k \times T_{\text{вв}} + b$, где k – угловой коэффициент; b – свободный член. Достоверность результатов анализа подтверждали, вычисляя коэффициент корреляции (r), который по модулю должен быть $\geq 0,99$ [5, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе работы проводили оценку специфичности валидируемой методики для опосредованной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Подготавливали 10 модельных образцов, добавляя к суспензиям 146S компонент, определяющих инфекционную активность вируса [1, 9], смесь 75S, 12S и 3,8S компонентов для выявления возможного их влияния на специфичность данной методики. Качественный и количественный состав модельных образцов, а также результаты определения относительной погрешности (e) при исследовании в ОТ-ПЦР-РВ отражены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, относительная погрешность опосредованного определения титра вируса ящура с помощью валидируемой методики при исследовании инфекционных частиц 9,00–8,03; 8,03–7,02; 7,02–6,04; 6,04–5,04; 5,04–4,00; 4,00–3,01; 3,01–2,05; 2,05–1,00; 1,00–0,50 $\lg$ ТЦД₅₀/см³ составляла 0,11–0,63; 0,12–0,57; 0,14–0,83; 0,17–0,79; 0,20–1,00; 0,50–1,99; 0,66–3,41; 0,49–5,00; 1,00–16,00% соответственно. То есть отмечали высокую специфичность методики для суспензий с титрами вируса ящура от 1,00 до 9,00 $\lg$ ТЦД₅₀/см³, при исследовании которых относительная погрешность не превышала 5%.

На следующем этапе работы оценивали правильность валидируемой методики, тестируя в ОТ-ПЦР-РВ 390 проб культурального вируса ящура с титрами инфекционной активности от 1,00 до 9,00 $\lg$ ТЦД₅₀/см³ (с шагом 0,25 $\lg$ ТЦД₅₀/см³). Значения титра, выходящие за указанный диапазон, не использовали в анализе, поскольку в процессе промышленного

Таблица 1

Оценка специфичности методики опосредованной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины с применением ОТ-ПЦР-РВ
($n = 6, M \pm m$)

№ смеси	Соотношение компонентов смеси		Титр вируса ящура, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$		Относительная погрешность (e) при расчете титра вируса методом ОТ-ПЦР-РВ, %
	146S частицы	75S + 12S + 3,8S компоненты	в клетках линии IB-RS-2	результаты ОТ-ПЦР-РВ в виде расчетных значений титра	
1	1	0	$9,00 \pm 0,09$	$8,98 \pm 0,02$	0,11–0,44
2	1	10	$8,03 \pm 0,08$	$8,02 \pm 0,04$	0,12–0,63
3	1	10^2	$7,02 \pm 0,13$	$7,00 \pm 0,02$	0,14–0,57
4	1	10^3	$6,04 \pm 0,18$	$6,02 \pm 0,03$	0,17–0,83
5	1	10^4	$5,04 \pm 0,15$	$5,02 \pm 0,03$	0,20–0,79
6	1	10^5	$4,00 \pm 0,14$	$3,99 \pm 0,03$	0,50–1,00
7	1	10^6	$3,01 \pm 0,18$	$3,05 \pm 0,02$	0,66–1,99
8	1	10^7	$2,05 \pm 0,14$	$2,01 \pm 0,03$	0,49–3,41
9	1	10^8	1,00*	$0,98 \pm 0,03$	1,00–5,00
10	1	$10^{8,7}$	0,50*	$0,53 \pm 0,05$	4,00–16,00

* значения титра получены с помощью теоретических расчетов, исходя из кратности разведений.

получения суспензий вируса ящура титр инфекционности преимущественно находится в диапазоне от 6,0 до 8,5 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Результаты исследования представлены на рисунке 1 в виде линейной функции $y = 0,9985x + 0,0113$, которая при степени достоверности (R^2) 0,9995 подтверждает, что тангенс угла наклона (k) стремится к единице ($k = 0,9985$), а свободный член (b) – к нулю ($b = 0,0113$). Из анализа полученных данных следует, что использование валидируемой методики позволяет получать достоверные результаты.

Проводили оценку прецизионности методики опосредованного определения титра инфекционной активности вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ с расчетом абсолютных и относительных показателей вариации данных анализа.

Прецизионность в условиях сходимости оценивали по вариабельности результатов ОТ-ПЦР-РВ внутри одного исследования 5 суспензий культурального вируса ящура с титрами: 1,0; 5,0; 7,0; 8,0; 9,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, которые одновременно тестировал один оператор на одном приборе в 20 повторениях. Результаты статистического анализа полученной совокупности пороговых циклов амплификации (Ct_j) отражены в таблице 2 и на рисунке 2. Из данных таблицы 2 следует, что размах вариации составил 0,05–0,22; среднее линейное отклонение – 0,007–0,042, то есть уровень вариации Ct_j в полученных выборках при указанных титрах вируса относительно средней величины признака был низким. Коэффициент дисперсии находился в диапазоне $9,4 \times 10^{-5}$ – $3,9 \times 10^{-3}$, среднее квадратичное отклонение составило 0,010–0,056, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений Ct_j от среднего арифметического (Ct_{cp}). Таким образом, по

результатам анализа абсолютных показателей вариации колеблемость индивидуальных значений в выборках низкая, а значения пороговых циклов амплификации представляют собой надежную совокупность.

Для исследования колеблемости полученных значений Ct_j внутри генеральной совокупности определяли относительные показатели вариации. Коэффициент осцилляции составлял 0,427–0,662%, следовательно, относительное изменение крайних значений Ct_j по сравнению со средней величиной во всех выборках низкое. Линейный коэффициент вариации находился в диапазоне 0,089–0,118%, следовательно, доля усредненного значения отклонений от Ct_{cp} в каждой совокупности незначительна. Коэффициент вариации индивидуальных значений пороговых циклов составил 0,116–0,158%, что соответствует общим требованиям, предъявляемым к валидируемым методикам ($C_v < 2\%$) [2, 5].

Как следует из таблицы 2 и рисунка 2, при увеличении титра вируса от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ отмечалось снижение вариации значений каждого из показателей внутри выборок, тем самым степень достоверности опосредованного количественного определения анализа с помощью ОТ-ПЦР-РВ возрастала. Таким образом, при исследовании суспензий вируса ящура с титрами от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в 20 повторениях с помощью предложенной методики одним оператором получены однородные и надежные совокупности значений пороговых циклов, которые можно применять для опосредованного выражения в виде титра вируса.

Следующий этап работы был посвящен исследованию прецизионности методики ОТ-ПЦР-РВ в условиях воспроизводимости. Для этого анализ суспензий культурального вируса ящура проводили два

оператора в разное время в 20 повторениях (40 измерений для каждой пробы). Полученные результаты отражены в таблице 3, из которой видно, что для генеральной совокупности значений пороговых циклов амплификации размах вариации (R) составил 0,06–0,37, среднее линейное отклонение (d_{cp}) – 0,008–0,040, иными словами, степень колеблемости Ct_i в полученных выборках относительно среднего уровня признака низкая. По итогам статистического анализа дисперсия (δ^2) в совокупностях составила $1,2 \times 10^{-5}$ – $3,9 \times 10^{-3}$, среднее квадратичное отклонение (δ) – 0,011–0,063, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений пороговых циклов амплификации от среднего арифметического и высокий уровень достоверности результатов внутри каждой выборки.

При оценке относительных показателей вариации Ct_i определили, что коэффициент осцилляции (V_R) составил 0,512–1,045%, линейный коэффициент вариации (C_d) – 0,095–0,114%, коэффициент вариации (C_g) – 0,132–0,177%, что соответствует общепринятым нормам ($C_g < 3\%$) [2, 7]. Исходя из полученных результатов, относительное изменение крайних значений пороговых циклов амплификации и доля усредненного значения абсолютных отклонений в сравнении со средним внутри каждой совокупности незначительны. При этом вариация значений параметров валидации при исследовании суспензий вируса ящура с увеличением титра от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ снижалась, а степень достоверности результатов возрастала.

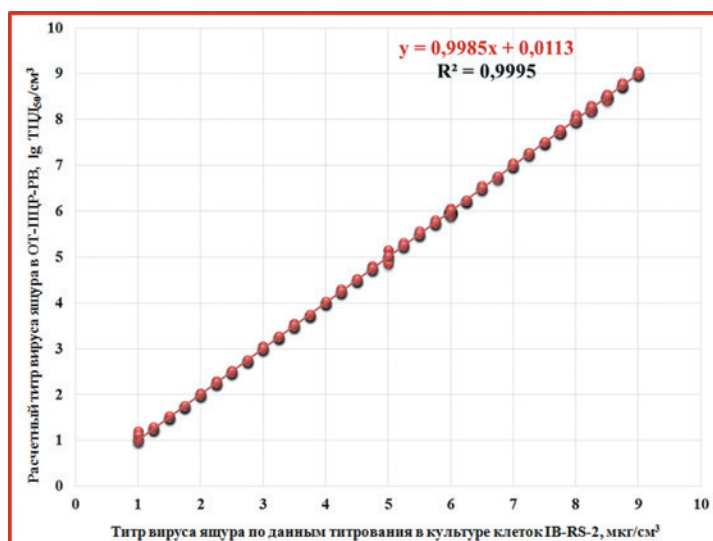


Рис. 1. Исследование правильности методики опосредованной оценки титра вируса ящура с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Сравнительный анализ данных, полученных при оценке прецизионности методики, позволил доказать, что в условиях сходимости степень достоверности результатов опосредованного определения титра вируса выше по сравнению с оценкой, проводимой в условиях воспроизводимости, что соответствует общепринятым статистическим ожиданиям [7]. При этом по всем

Таблица 2

Исследование прецизионности методики для опосредованной оценки титра вируса ящура с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Валидационные показатели методики при оценке прецизионности	Значения показателей валидации при исследовании суспензий с разными титрами вируса ящура, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$									
	условия сходимости					условия воспроизводимости				
	1,0	5,0	7,0	8,0	9,0	1,0	5,0	7,0	8,0	9,0
Объем выборки пороговых циклов амплификации (N)	20	20	20	20	20	40	40	40	40	40
Среднее значение пороговых циклов амплификации (Ct_{φ})	35,390	21,847	15,110	11,710	8,353	35,397	21,848	15,107	11,71	8,354
Суммарное значение индивидуального линейного отклонения по модулю ($\sum d_i $)	0,833	0,471	0,304	0,232	0,148	1,612	1,002	0,652	0,490	0,316
Суммарное значение квадрата модуля индивидуального линейного отклонения ($\sum d_i^2$)	0,063	0,021	0,009	0,004	0,002	0,158	0,051	0,018	0,010	0,005
Наибольшее значение порогового цикла ($Ct_{\max}$)	35,50	21,94	15,16	11,74	8,37	35,58	21,94	15,17	11,74	8,39
Наименьшее значение порогового цикла ($Ct_{\min}$)	35,28	21,80	15,06	11,69	8,32	35,21	21,78	15,06	11,68	8,33
Размах вариации (R)	0,22	0,14	0,10	0,05	0,05	0,37	0,16	0,11	0,06	0,06
Среднее линейное отклонение (d_{cp})	0,042	0,024	0,015	0,012	0,007	0,040	0,025	0,016	0,012	0,008
Дисперсия (δ^2)	$3,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-5}$
Среднее квадратичное отклонение (δ)	0,056	0,032	0,021	0,014	0,010	0,063	0,035	0,021	0,016	0,011
Коэффициент осцилляции (V_R), %	0,622	0,640	0,662	0,427	0,599	1,045	0,732	0,728	0,512	0,718
Линейный коэффициент вариации (C_d), %	0,118	0,108	0,100	0,097	0,089	0,114	0,112	0,108	0,105	0,095
Коэффициент вариации (C_g), %	0,158	0,148	0,137	0,123	0,116	0,177	0,164	0,141	0,134	0,132

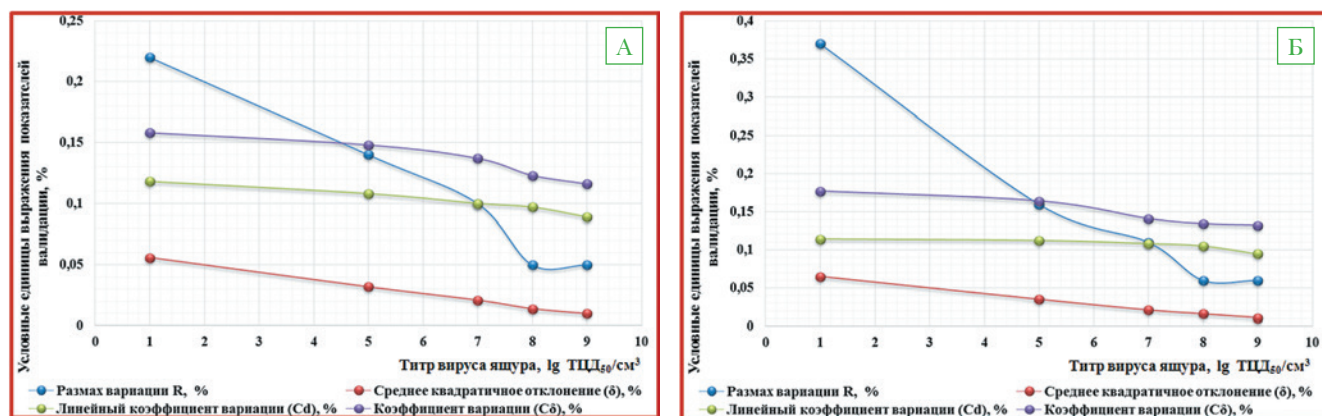


Рис. 2. Изменение значений валидационных показателей при оценке правильности методики опосредованного определения титра вируса ящура с помощью ОТ-ПЦР-РВ в условиях сходимости (А) и воспроизводимости (Б)

абсолютным и относительным показателям вариации валидируемая методика ОТ-ПЦР-РВ удовлетворяла критериям приемлемости [2, 7, 11].

На следующем этапе исследования опосредованно методом ОТ-ПЦР-РВ определяли предел обнаружения ($ПО_{\text{ТВЯ}}$) и количественного определения ($ПКО_{\text{ТВЯ}}$) титра

вируса ящура в сырье для вакцины. Проведя исследования в 10 повторениях, получили следующие значения свободного члена (b): 11,461; 11,465; 11,469; 11,470; 11,465; 11,466; 11,465; 11,465; 11,452; 11,461. Учитывая, что стандартное отклонение свободного члена (S_b) составило 0,005, а тангенс угла наклона (k) был равен $-3,38$,

Таблица 3

Выявление предела количественного опосредованного определения титра вируса ящура с помощью валидируемой методики ОТ-ПЦР-РВ ($n = 5, M \pm m$)

№ суспензии вируса ящура	Титр вируса ящура		Исследование суспензии в ОТ-ПЦР-РВ		Факт экспериментального подтверждения: $ПО_{\text{ТВЯ}} = 0,00 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$; $ПКО_{\text{ТВЯ}} = 0,48 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$
	$\text{TCID}_{50}/\text{см}^3$	$\lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$	пороговый цикл	результаты в виде расчетных значений титра вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$	
1	0,63	-0,2	$39,31 \pm 0,45$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
2	0,79	-0,1	$39,15 \pm 0,41$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
3	1,00	0,0	$38,79 \pm 0,69$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
4	1,26	0,1	$38,49 \pm 0,52$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
5	1,58	0,2	$38,15 \pm 0,66$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
6	2,00	0,3	$37,79 \pm 0,42$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
7	2,51	0,4	$37,47 \pm 0,48$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
8	3,16	0,5	$37,09 \pm 0,09$ ($p < 0,005$)	$0,50 \pm 0,02$	подтверждено
9	4,00	0,6	$36,76 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)	$0,60 \pm 0,02$	подтверждено
10	5,00	0,7	$36,42 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)	$0,70 \pm 0,02$	подтверждено
11	6,31	0,8	$36,08 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)	$0,79 \pm 0,01$	подтверждено
12	7,94	0,9	$35,74 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)	$0,90 \pm 0,01$	подтверждено
13	10,00	1,0	$35,40 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)	$1,01 \pm 0,02$	подтверждено

н/о – титр вируса достоверно не определен.

Таблица 4

Оценка параметров валидации методики опосредованного определения титра вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ

Параметр валидации методики	Валидационный показатель	Значения показателей валидации методики при исследовании вируса ящура с разными титрами, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$					
		0,5	1,0	5,0	7,0	8,0	9,0
Специфичность	относительная погрешность (e), %	4–16	1–5	0,2–0,79	0,14–0,57	0,12–0,63	0,11–0,44
Сходимость	среднее квадратичное отклонение (δ), %	н/и	0,056	0,032	0,021	0,014	0,010
	коэффициент вариации (C_v), %	н/и	0,158	0,148	0,137	0,123	0,116
Воспроизводимость	среднее квадратичное отклонение (δ), %	н/и	0,063	0,035	0,021	0,016	0,011
	коэффициент вариации (C_v), %	н/и	0,177	0,164	0,141	0,134	0,132
Линейность	коэффициент корреляции (r)	н/и	0,9997				
Правильность	степень достоверности (R^2)	н/и	0,9995				
	тангенс угла наклона (k)	н/и	0,9985				
	свободный член (b)	н/и	0,0113				
Аналитическая область	диапазон опосредованного количественного определения титра вируса ящура, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	0,50–9,00					

н/и – не исследовали.

провели расчеты и определили, что $\text{ПО}_{\text{Тв}}^{\text{Тв}}$ данной методикой составил 1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (или 0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), а $\text{ПКО}_{\text{Тв}}^{\text{Тв}}$ – 3 $\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (или 0,48 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Выявленное значение $\text{ПКО}_{\text{Тв}}^{\text{Тв}}$ подтверждали экспериментально при исследовании 13 модельных образцов культурального вируса ящура с титрами от –0,2 до 1,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в 5 повторениях. Результаты анализа представлены в таблице 3.

Как следует из данных таблицы 3, экспериментальным путем подтвердили, что минимальный $\text{ПКО}_{\text{Тв}}^{\text{Тв}}$ валидируемой методикой составляет 0,50 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

При исследовании 11 модельных образцов с титрами вируса ящура от 0,50 до 9,50 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ определили, что аналитическая область опосредованной оценки титра инфекционности с помощью ОТ-ПЦР-РВ находилась в диапазоне 0,50–9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при значениях пороговых циклов от $37,08 \pm 0,09$ до $8,34 \pm 0,03$ ($n = 5$, $p < 0,005$). По всей видимости, при титрах более 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ предложенная регрессионная модель не позволяла проводить достоверный опосредованный количественный анализ по причине высокого содержания полных вирусных частиц ($n = 5$, $p > 0,01$).

Следующий этап работы был посвящен проверке линейной зависимости порогового цикла амплификации и титра вируса в пределах аналитической области методики. Для этого исследовали 40 вирусосодержащих суспензий с титрами от 1,00 до 9,00 $\text{мкг}/\text{см}^3$ в 5 повторениях. Суспензии с титрами вируса менее 1,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ для анализа не использовали, поскольку в производственной работе они не применяются. В результате анализа получена регрессия вида $T_{\text{в}} = -0,2956C_t + 11,465$ с коэффициентом корреляции (r), равным 0,9997, что позволяет судить о достоверности результатов статистического анализа.

По итогам проведенных исследований осуществлена оценка основных параметров валидации методики опосредованного определения титра вируса

ящура в сырье для вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Итоговые результаты анализа приведены в таблице 4, из которой видно, что диапазон применения ОТ-ПЦР-РВ составил 0,50–9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При тестировании вирусосодержащего материала с титрами от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ валидируемая методика характеризуется высокой специфичностью (e составляет 0,11–5,00%), а также высокой прецизионностью в условиях сходимости (δ находилось в диапазоне 0,010–0,056%, $\delta < 2\%$, $C_v = 0,116$ –0,156%, $C_v < 2\%$) и воспроизводимости (δ составило 0,011–0,063%, $\delta < 3\%$, $C_v = 0,132$ –0,177%, $C_v < 3\%$). При оценке линейности и правильности доказано, что валидируемая методика дает свободные от ошибки результаты с высоким коэффициентом корреляции ($r = 0,995$, $r \rightarrow 1$) и степенью достоверности ($R^2 = 0,991$, $R^2 \rightarrow 1$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка основных валидационных характеристик методики опосредованного определения титра вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ с применением регрессионной модели $T_{\text{в}} = -0,2956C_t + 11,4650$. Определено, что аналитическая область методики находится в диапазоне 0,50–9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Доказана высокая специфичность ОТ-ПЦР-РВ при исследовании суспензий вируса ящура с титрами от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Разработанная методика характеризуется высокой прецизионностью в условиях сходимости и воспроизводимости и соответствует общепризнанным требованиям относительно линейности и правильности [2, 7, 11, 12].

Результаты валидации ОТ-ПЦР-РВ удовлетворяют всем критериям приемлемости. Исходя из этого, предложенная методика является достоверной и может быть использована для опосредованной количественной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Взаимосвязь инфекционности и концентрации 146S частиц в суспензии лапинизированного вируса ящура / М. В. Котова, В. Л. Узюмов, О. Г. Андреева, М. Г. Удалых // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тез. докладов науч. конф. ВНИИИ. – Владимир, 1983. – С. 46–48.
2. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1–6. – Введ. 01.11.02. – М.: Стандартинформ, 2006.
3. Государственная фармакопея РФ. Ч. 1. – 12-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. – С. 254–266.
4. Жильцова М. В. Биологические свойства эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О и Азия-1: автореф. дис. ... канд. наук. – Владимир, 2008. – 23 с.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Пономарев А. П., Узюмов В. Л., Груздев К. Н. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. – Владимир: Фолиант, 2006. – 250 с.
7. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. – URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик-теория> (дата обращения: 12.11.18).
8. Способ определения титра инфекционной активности вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: пат. 2674076 Российская Федерация, МПК⁷ А61К 39/135 / Д. В. Михалишин, М. И. Доронин, В. А. Стариков [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – № 2017145889/10; заявл. 25.12.17; опубл. 04.12.18.
9. Щербakov А. В., Тимина А. М., Перевозчикова Н. А. Разработка ПЦР в реальном времени для обнаружения и количественного определения вируса ящура // Рос. вет. журн. С.-х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – Сент. – С. 26–27.
10. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease / A. E. Shaw, S. M. Reid, K. Ebert [et al.] // J. Virol. Methods. – 2007. – Vol. 143 (1). – P. 81–85; DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.
11. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases / OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). – Chapter 1.1.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (дата обращения: 02.11.18).
12. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases / OIE. – 2nd ed. – Paris: OIE, 2008. – 70 p.

REFERENCES

1. Interrelation between infectivity and 146S particle concentration in lapinized foot-and-mouth disease virus suspension [Vzaimosvyaz' infekcionnosti i koncentracii 146S chastic v suspenzii lapinizirovannogo

virusa yashchura]. M. V. Kotova, V. L. Uzyumov, O. G. Andreyeva, M. G. Udalykh. *Aktual'nye problemy veterinarnoj virusologii: scientific conference abstracts All-Union Foot and Mouth Disease Research Institute*. Vladimir, 1983: 46–48 (in Russian).

2. GOST R ISO 5725-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results [Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij]. Part 1–6. Put into force on 01.11.02. M.: Standartinform, 2006 (in Russian).

3. RF National Pharmacopeia Part 1. [Gosudarstvennaya farmakopeya RF]. 12th ed. M.: Scientific Centre for Medical Device Examination, 2008: 254–266 (in Russian).

4. Zhiltsova M. V. Biological properties of epidemic type A, O and Asia-1 foot-and-mouth disease virus isolates [Biologicheskie svoystva ehpozooticheskikh izolyatov virusa yashchura tipov A, O i Aziya-1]: author's abstract ... for Candidate of Science degree. Vladimir, 2008 (in Russian).

5. Lakin G. F. Biometrics: text book for Biological Higher Educational Institutes [Biometriya: uchebnoe posobie dlya biol. spec. vuzov]. 4th ed., revised and amended. M.: Vyshaya shkola, 1990 (in Russia).

6. Ponomarev A. P., Uzyumov V. L., Grudev K. N. Foot-and-mouth disease virus: its structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svoystva]. Vladimir: Foliant. 2006 (in Russian).

7. Manual of GMP. Validation of analytical methods: theory [Praktikum po GMP. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya]. P. Nosyrev, M. Nosyрева, T. Rasskazova, N. Korneyeva. URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик-теория> (access date: 12.11.18) (in Russian).

8. Method for determination of foot-and-mouth disease virus infectivity titre in non-inactivated raw materials used for vaccine production with real-time reverse transcription polymerase chain reaction [Sposob opredeleniya titra infekcionnoj aktivnosti virusa yashchura v neinaktivirovannom syr'e dlya vakciny s primeneniem metoda obratnoj transkripcii i polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni]: pat. 2674076 Russian Federation, MPK⁷ A61K 39/135. D. V. Mikhailishin, M. I. Doronin, V. A. Starikov [et al.]; FGBI "ARRIAH". No. 2017145889/10; submitted on 25.12.17; published on 04.12.18 (in Russian).

9. Scherbakov A. V., Timina A. M., Perevozchikova N. A. Development of real-time PCR for foot-and-mouth disease virus detection and quantification [Razrabotka PCR v real'nom vremeni dlya obnaruzheniya i kolichestvennogo opredeleniya virusa yashchura]. *Russian Veterinary Journal. Productive animals. Special issue devoted to the 50th anniversary of the FGBI "ARRIAH"*. 2008; September: 26–27 (in Russian).

10. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. A. E. Shaw, S. M. Reid, K. Ebert [et al.]. *J. Virol. Methods*. 2007; 143 (1): 81–85; DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.

11. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE. *Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. Chapter 1.1.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (access data: 02.11.18).

12. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. 2nd ed. Paris: OIE, 2008.

Поступила 17.01.19
Принята в печать 22.02.19

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ

М. Н. Гусева¹, М. И. Доронин², М. А. Шевченко³, Д. В. Михалишин⁴, А. А. Шишкова⁵

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

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

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

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

⁵ Главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shishkova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В биотехнологии производства противоящурных вакцин важнейшим условием получения полноценного конечного продукта является использование высококачественных питательных сред, к основным компонентам которых, обеспечивающим их питательную ценность, относятся белковые гидролизаты. Большое значение имеет контроль входящего сырья, в частности, оценка качества гидролизата белков крови различных серий. В настоящее время существуют различные методики, позволяющие определять эффективность гидролизатов с применением в качестве тест-систем культур клеток и одноклеточных организмов. В представленной работе в качестве модели для оценки биологической активности и токсичности гидролизата белков крови в сырье для производства противоящурных вакцин использовали суспензионную клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21). Для подтверждения достоверности полученных результатов исследования проведена процедура валидации предложенной методики. При исследовании 560 проб гидролизата белков крови определены основные валидационные характеристики методики: правильность, специфичность, чувствительность, а также прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости. Результаты валидации предложенной методики имели высокий уровень достоверности (критерий Фишера – 0,021; $\leq 0,050$) и полностью соответствовали критериям приемлемости.

Ключевые слова: гидролизат белков крови, биологическая активность, токсичность, специфичность, чувствительность тест-системы, правильность методики, прецизионность.

UDC 619:578.835.2:57.082.26:612.124

EVALUATION OF SUITABILITY OF METHODS FOR TESTING BLOOD PROTEIN HYDROLYSATES FOR THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY AND TOXICITY

M. N. Guseva¹, M. I. Doronin², M. A. Shevchenko³, D. V. Mikhlishin⁴, A. A. Shishkova⁵

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

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

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

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

⁵ Chief Technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: shishkova@arriah.ru

SUMMARY

The use of high quality nutrient media comprising protein hydrolysates as the main components for maintaining their nutrient value is a critical prerequisite for appropriate final product preparation in FMD vaccine biotechnology. The incoming control of raw materials, in particular testing blood protein hydrolysates of different batches for their quality, is of considerable importance. Currently, there are different methods for the determination of hydrolysate efficacy using cell cultures and unicellular organisms as test systems. We used suspended baby hamster kidney (BHK-21) cell line as a model for testing blood protein hydrolysates in the raw materials intended for FMD vaccine production for their biological activity and toxicity. The validation of the proposed method was carried out to confirm the reliability of the test results obtained. The following main validation characteristics were determined through testing 560 blood protein hydrolysate samples: trueness, specificity, sensitivity, as well as precision under repeatability and reproducibility conditions. The validation results for the proposed method demonstrated high reliability (Fisher's criterion – 0.021; ≤ 0.050) and full compliance with acceptance criteria.

Key words: blood protein hydrolysate, biological activity, toxicity, specificity, test-system sensitivity, trueness of methods, precision.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клеточной биотехнологии четко определено и интенсивно развивается направление, связанное с созданием питательных сред, содержащих гидролизаты белкового сырья в качестве ростовой аминокислотной и пептидной составляющей [3, 7, 9].

Малейшие отклонения от технологического процесса могут привести к появлению токсичности гидролизата белков крови (ГБК), снижению ростовых свойств питательных сред, в составе которых используется ГБК, вплоть до гибели клеток [7, 11]. Поэтому в биотехнологическом производстве важен контроль входящего сырья, в частности, оценка качества ГБК различных серий.

На сегодняшний день существуют различные методики, позволяющие определять эффективность гидролизатов с применением в качестве тест-систем культур клеток и одноклеточных организмов [10]. Однако, в результате анализа научных публикаций, сведений о применении суспензионной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) в качестве модели для оценки биологической активности и токсичности ГБК обнаружено не было.

В системе контроля входящего сырья необходимы гарантии достоверности результатов анализа. Для этого предусмотрена процедура валидации аналитических методов, которая является одним из элементов контроля всего процесса производства лекарств [13].

Валидация – это процесс подтверждения качественного выполнения всех требований, предъявляемых для конкретного применения, на основании представления объективных доказательств (ISO 9000:2005) [5]. Процесс валидации предполагает определение объективных параметров тест-системы, к которым относятся правильность, сходимость, воспроизводимость при разных условиях проведения теста, специфичность и чувствительность [1, 2, 12, 13].

Обеспечение достоверности полученных результатов исследования возможно исключительно при использовании точной методики. В метрологии точность – это близость результата измерений к эталонному значению величины [4]. Для полного раскрытия понятия точности количественной методики используют термины «правильность» и «прецизионность». Под правильностью понимают степень близости экспериментальных результатов к истинному значению во всей области измерений. Главным фактором, определяющим правильность, является значение систематической погрешности. Прецизионностью является близость между независимыми результатами, полученными при определенных принятых условиях постановки эксперимента. Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.). Для оценки степени достижения необходимого качества результатов проводят анализ повторяемости в условиях сходимости и воспроизводимости, определяя абсолютные и относительные показатели вариации [1, 8, 13].

Целью исследования была оценка пригодности методики определения биологической активности и наличия/отсутствия токсичности гидролизата белков крови разных серий для проведения анализа сырья при изготовлении противоящурных вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. В работе использовали суспензионную клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) 1-го и 2-го пассажей с концентрацией не ниже $3,0 \times 10^6$ кл./мл.

Среда для культивирования клеток. Для выращивания клеток линии ВНК-21 применяли культуральную среду на основе раствора Хэнкса, содержащую необходимый для роста клеток набор солей, аминокислот и витаминов, дополненную 5% сыворотки плодов коров фирмы SERANA, инактивированной при температуре 56°C в течение 30 мин, а также исследуемый ГБК. Стерилизацию ГБК проводили паровоздушным методом автоклавирования при температуре $132 \pm 2^\circ\text{C}$ и давлении 0,2 МПа в течение 1 ч.

Определение биологической активности ГБК. Выращивание клеток линии ВНК-21 осуществляли в культуральных флаконах с приготовленным раствором питательной среды и посевной концентрацией клеток $0,4\text{--}0,7 \times 10^6$ кл./мл. Для оценки биологической активности ГБК тестировали в двух концентрациях: 0,25 и 0,50% по сухому веществу. Инкубацию клеток осуществляли в стеклянных культиваторах, помещенных в термостатируемый шейкер Incubation Schüttelschrank BS 4 со скоростью перемешивания суспензии 150 ± 5 об/мин и при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Показатель кислотности клеточной суспензии поддерживали на уровне 7,0–7,2 с использованием стерильного 7,5%-го раствора гидрокарбоната натрия. Пересев клеток проводили каждые 48 ч в течение 5 последовательных пассажей.

Определение кратности прироста клеток. Концентрацию клеток ВНК-21 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови. Количество клеток в 1 мл суспензии рассчитывали по формуле [11]:

$$X = \frac{A \times B \times 4000}{3600} \times 1000,$$

где X – количество клеток в 1 мл;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

Увеличение концентрации клеток оценивали по кратности прироста (КП), пользуясь формулой:

$$\text{КП} = \frac{a}{b},$$

где a – концентрация клеток через 48 ч после посева;

b – посевная концентрация клеток.

Интерпретация результата исследования биологической активности и токсичности ГБК. Оценка качества ГБК по среднему значению КП проводилась следующим образом:

- если среднее значение КП ($\text{КП}_{\text{ср}}$) за 5 пассажей составляло 4,5–5,0, то ГБК считали биологически активным;
- если $\text{КП}_{\text{ср}}$ находилось в диапазоне от 3,0 до 4,5, то гидролизат оценивали как удовлетворительный;
- если $\text{КП}_{\text{ср}}$ ниже 3,0, то ГБК выбраковывали.

Токсичность ГБК оценивали следующим образом: если на протяжении 5 последовательных пассажей клетки линии ВНК-21 оставались живыми (в 4-м и 5-м пассажах допускалось не менее 60%), то такой ГБК считался нетоксичным. В противном случае гидролизат выбраковывали.

Такая интерпретация результатов была принята, поскольку определение биологической активности и токсичности ГБК проводилось при выращивании клеток без внешнего поступления 5% углекислого газа. В таких условиях к 4–5-му пассажу их жизнеспособность резко снижалась.

Оценка правильности методики. Для оценки правильности методики осуществляли исследование ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50%, а также образца только с 5% прогретой сыворотки плодов коров в 3 повторностях. Для характеристики набора полученных данных применяли понятие «персентиль», которое определяет ранги элементов выборки в виде процентов таким образом, что наименьшему значению элемента данных соответствует персентиль, равный 0%, наибольшему – 100%, медиане – 50% и т. д. Промежуточные значения имеют персентили, расположенные с шагом $100/(n - 1)$. Для проведения сравнительного анализа дисперсий 2 вариационных рядов (с 0,25 и 0,50% ГБК) проводили расчет критерия Фишера (F) [4].

Оценка специфичности методики. Под специфичностью понимают возможность методики определять пробы в качестве отрицательных относительно всех исследуемых заведомо отрицательных образцов. В данной работе отрицательными (подвергшимися выбраковыванию) считали ГБК, которые проявляли токсичность для суспензионной перевиваемой клеточной линии ВНК-21 и индуцировали кратность прироста менее 3,0. Анализ данных образцов проводили в 3 повторностях, по итогам которых определяли среднее значение кратности прироста клеток и доказывали, что исследуемые серии ГБК являлись не подходящими для производственных целей.

Оценка чувствительности методики. Для оценки чувствительности осуществляли исследование заведомо положительных проб и определяли значение кратности прироста суспензионной культуры клеток ВНК-21.

Оценка промежуточной прецизионности в условиях воспроизводимости и сходимости. Для оценки прецизионности количественной методики определения биологической активности ГБК осуществляли исследование в одних и тех же условиях измерения (оборудование, лаборатория, временной промежуток – 10 сут, один оператор), кроме фактора отличия суспензии клеток (разные пассажы). Анализ также проводили в одних и тех же условиях измерения (оборудование, клеточная суспензия, лаборатория, кроме фактора субъективности (тест выполнен двумя операторами)) и временного промежутка (в течение 24 сут). Исследо-

вания проводили в 3 повторностях. Для оценки прецизионности количественной методики в условиях сходимости и воспроизводимости рассчитывали абсолютные и относительные показатели вариации.

Определение абсолютных показателей вариации. Размах вариации (R) рассчитывали как разность между наибольшим и наименьшим значениями порогового цикла амплификации: $R = Ct_{\max} - Ct_{\min}$. Индивидуальное линейное отклонение (d_i) находили по формуле: $d_i = |Ct_i - Ct_{cp}|$. Среднее линейное отклонение (d_{cp}) рассчитывали как среднее арифметическое из индивидуальных линейных отклонений по формуле:

$$d_{cp} = \sum |d_i| / N,$$

где d_i – индивидуальные линейные отклонения;
N – объем совокупности.

Оценку дисперсии (δ^2) показателей проводили с использованием формулы: $\delta^2 = (\sum d_i^2) / N$. Для характеристики размеров вариации рассчитывали среднее квадратичное отклонение (δ), пользуясь формулой: $\delta = \sqrt{(\delta^2)}$ [1, 8].

Определение относительных показателей вариации. Относительное стандартное отклонение (RSD) находили по формуле: $RSD = \delta / Ct_{cp}$. Расчет коэффициента осцилляции (V_R) проводили, пользуясь формулой: $V_R = (R / Ct_{cp}) \times 100$. Линейный коэффициент вариации (C_d) рассчитывали по формуле: $C_d = (d_{cp} / Ct_{cp}) \times 100$. Для оценки колеблемости индивидуальных значений пороговых циклов амплификации определяли коэффициент вариации (C_δ) по формуле: $C_\delta = (\delta / Ct_{cp}) \times 100$ [1, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы оценивали правильность методики определения биологической активности ГБК. Главным фактором, определяющим этот параметр, является систематическая погрешность при сравнении с результатами ранее предложенного метода. Однако по итогам анализа научных данных методики, которые применяли для исследования именно биологической активности ГБК, найдены не были. Поэтому для проведения сравнительного анализа осуществляли культивирование клеток линии ВНК-21 в ростовой среде, содержащей 5% прогретой сыворотки плодов коров, и в такой же среде, но с добавлением ГБК. Результаты тестирования контрольных образцов ГБК в течение 5 последовательных пассажей в 3 повторениях отражены в таблице 1 и на рисунке.

Из данных таблицы 1 видно, что кратность прироста при использовании ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50%

Таблица 1
Оценка правильности методики определения биологической активности гидролизата белков крови

№ п/п	Характеристика образца		Кратность прироста в течение 5 пассажей/процент живых клеток				
			ожидаемый результат	полученный результат			$M \pm m$
				1-е повторение	2-е повторение	3-е повторение	
1	ГБК 0,25% (серия 6)	сыворотка плодов коров 5%	≥4,5/98–100	5,8/98	4,9/98	5,5/98	5,2 ± 0,3
2	ГБК 0,50% (серия 6)	сыворотка плодов коров 5%	≥4,5/98–100	5,2/99	4,4/99	6,3/98	5,3 ± 0,9
3	сыворотка плодов коров 5%		<3,0/98–100	1,9/99	2,0/98	2,2/99	2,0 ± 0,1

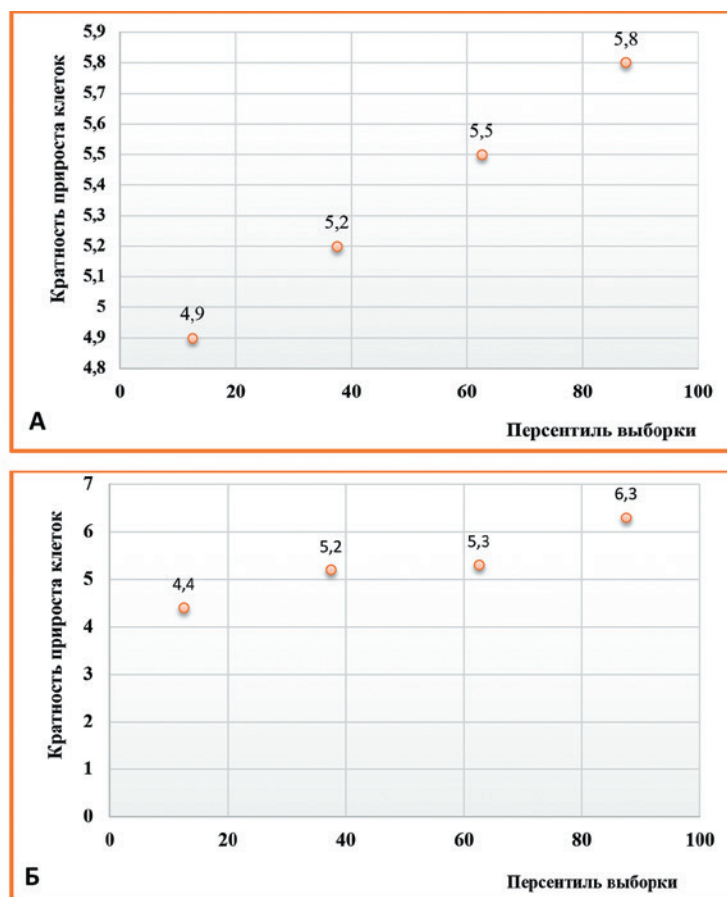


Рис. Оценка правильности валидируемой методики при анализе биологически активных образцов с содержанием ГБК в концентрации 0,25% (А) и 0,50% (Б)

составляла 5,2–5,3. При использовании только сыворотки плодов коров популяция клеток уменьшалась более чем в 2 раза.

Результаты исследования продемонстрированы на рисунке в виде уравнений $y_x = 5,989 + 0,3158x$ (А), $y_x = -3,653 - 4,421x$ (Б) и доказывают, что при использовании ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50% интенсивность прироста клеток линии ВНК-21 удовлетворяла требованию $>3,0$ в соответствии с разработанной методикой [11].

При исследовании 560 проб ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50%, проведенном с применением разработанной методики, получили данные, статистический анализ которых позволил сделать вывод о том, что при содержании ГБК в концентрации 0,25% критерий Фишера (F) соответствовал 0,021, что значительно меньше 0,05. Иными словами, представленная модель была значима. При увеличении гидролизата до 0,50% рассматриваемый критерий равнялся 2,08, что значительно больше 0,05, следовательно, модель была статистически незначима [4].

Таким образом, из анализа полученных данных следует, что использование валидируемой методики при концентрации ГБК, равной 0,25%, давало свободные от ошибки результаты. При увеличении содержания гидролизата до 0,50% представленная методика может применяться для оценки токсичности препарата путем определения процента живых клеток в суспензии.

На следующем этапе работы определяли специфичность методики исследования биологической активности ГБК при тестировании 14 токсичных проб в суспензионной перевиваемой клеточной линии ВНК-21 в течение 3 последовательных пассажей в 3 повторениях. Результаты анализа представлены в таблице 2.

При концентрации гидролизата, равной 0,25%, кратность прироста снижалась до 1,2–1,8, а доля живых клеток составляла 40–60%. При содержании ГБК в концентрации 0,50% кратность прироста была равна 0,7–1,5, доля живых клеток при этом находилась в диапазоне 25–42%. Таким образом, результаты анализа показали, что в суспензионной клеточной линии ВНК-21 все пробы ГБК проявляли токсичность, что выражалось в гибели клеток (доля живых клеток $<60\%$) и снижении кратности прироста ($КП < 3,0$) [10]. Исходя из того, что все 14 отрицательных проб были определены как токсичные, сделан вывод – специфичность валидируемой методики составляет 100%.

Следующий этап исследования был посвящен оценке чувствительности предложенного метода определения биологической активности ГБК с концентрацией 0,25% при тестировании 546 заведомо качественных проб гидролизата. Результаты анализа представлены в таблице 3.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что 76% исследуемых образцов были определены в качестве биологически активных ($4,5 < КП < 5,0$) и 24% признаны удовлетворительными ($3,0 < КП < 4,5$) для производственных целей. Таким образом, при анализе 546 заведомо качественных образцов ГБК все пробы были определены как пригодные для работы. Это подтверждает, что предложенная тест-система для определения биологической активности ГБК обладает высокой чувствительностью.

На следующем этапе работы проводили оценку прецизионности методики в условиях сходимости, тестируя пробы в 3 повторностях, выполненных в одних и тех же условиях измерения (оборудование, лаборатория, временной промежуток – 10 сут, один оператор), кроме фактора отличия суспензии клеток по номеру пассажа.

Результаты статистического анализа представлены в таблице 4, из которой видно, что при исследовании 2 серий ГБК с концентрацией 0,25% в течение 3 последовательных пассажей среднее линейное отклонение ($d_{\text{лп}}$) составило 0,044–0,067, следовательно, степень колеблемости $КП_i$ во всех выборках относительно среднего уровня признака низкая. Коэффициент вариации (C_v) варьировал от 0,878 до 1,899 ($\leq 2\%$) [1, 8], что подтверждает высокую степень достоверности результатов внутри каждой выборки. При анализе 2 серий ГБК с концентрацией 0,50% в течение 3 последовательных пассажей значение $d_{\text{лп}}$ составило 0,044–0,089. Иными словами, степень различий $КП_i$ относительно среднего показателя низкая, при этом значение статистической величины C_v находилось в диапазоне 0,918–1,768 ($\leq 2\%$) [1]. Таким образом, результаты исследования для каждой выборки являются достоверными.

Проводили также анализ прецизионности методики в условиях воспроизводимости. Для этого 2 серии ГБК тестировали в 3 повторениях в одних и тех же условиях измерения (оборудование, клеточная суспензия, лаборатория), кроме фактора субъективности (тест выполнен двумя операторами в разное время) и временного

Таблица 2
Оценка специфичности методики оценки биологической активности и токсичности ГБК

№ п/п	Кратность прироста в течение 3 пассажей/процент живых клеток													
	ожидаемый результат		полученный результат											
			0,25% ГБК						0,50% ГБК					
			1-й пассаж		2-й пассаж		3-й пассаж		1-й пассаж		2-й пассаж		3-й пассаж	
1	<3,0	<60%	1,8 ± 0,1	60	1,7 ± 0,1	55–56	1,4 ± 0,2	42–44	1,5 ± 0,2	42–43	1,3 ± 0,1	40	1,0 ± 0,2	35–38
2			1,5 ± 0,1	58–60	1,5 ± 0,2	52–55	1,2 ± 0,1	45–46	1,3 ± 0,1	42–44	1,3 ± 0,2	40–42	1,1 ± 0,1	29–30
3			1,4 ± 0,1	55–58	1,3 ± 0,2	50–52	1,2 ± 0,3	45–48	1,2 ± 0,2	40	1,1 ± 0,2	40–43	0,8 ± 0,1	30
4			1,5 ± 0,2	58–60	1,3 ± 0,1	51–53	1,3 ± 0,1	40–45	1,4 ± 0,2	41–43	1,2 ± 0,2	38–39	1,0 ± 0,2	35
5			1,6 ± 0,1	59–60	1,5 ± 0,1	50–55	1,3 ± 0,1	42–44	1,5 ± 0,1	35–38	1,3 ± 0,2	31–34	0,9 ± 0,1	28–31
6			1,7 ± 0,1	60	1,5 ± 0,1	49–55	1,2 ± 0,2	40–42	1,5 ± 0,1	39–40	1,4 ± 0,1	33–39	1,0 ± 0,1	25–38
7			1,7 ± 0,2	56–57	1,5 ± 0,1	50–55	1,3 ± 0,1	40–45	1,5 ± 0,1	40	1,3 ± 0,3	35–41	0,9 ± 0,1	26–29
8			1,5 ± 0,1	54–58	1,3 ± 0,2	50–54	1,3 ± 0,1	41–43	1,3 ± 0,1	42–45	1,2 ± 0,1	35–38	0,9 ± 0,2	25–26
9			1,4 ± 0,1	55–60	1,3 ± 0,1	45–51	1,2 ± 0,1	40	1,3 ± 0,1	41	1,2 ± 0,1	35–36	0,8 ± 0,1	25–30
10			1,7 ± 0,1	54–58	1,6 ± 0,1	46–50	1,4 ± 0,2	42–45	1,4 ± 0,1	40–44	1,0 ± 0,1	30–35	0,9 ± 0,1	29–31
11			1,7 ± 0,1	52–55	1,5 ± 0,2	44–48	1,3 ± 0,1	40–44	1,5 ± 0,1	42–44	1,2 ± 0,1	34–39	1,0 ± 0,2	28–30
12			1,6 ± 0,2	50–55	1,5 ± 0,2	45–50	1,2 ± 0,2	40–45	1,3 ± 0,1	36–37	1,1 ± 0,1	30–33	0,8 ± 0,1	29–34
13			1,6 ± 0,2	49–54	1,4 ± 0,2	45–50	1,2 ± 0,1	40–42	1,2 ± 0,2	35–40	1,0 ± 0,2	33–40	0,8 ± 0,1	25–28
14			1,6 ± 0,1	54–60	1,3 ± 0,1	47–48	1,2 ± 0,1	40	1,2 ± 0,1	36–42	1,0 ± 0,2	35–38	0,7 ± 0,1	28–32

промежутка (в течение 24 сут). Результаты исследования продемонстрированы в таблице 5.

По итогам статистического анализа 2 серий ГБК с концентрацией 0,25% в течение 3 последовательных пассажей среднее линейное отклонение составило 0,030–0,060, а с концентрацией 0,50% – 0,027–0,043. Иными словами, степень изменений КП₁ в представленных совокупностях низкая. Коэффициент вариации (C_v) при оценке ГБК с концентрацией 0,25% варьировал от 1,185 до 2,234, ГБК с содержанием в концентрации 0,50% – от 1,375 до 1,913 (≤3%) [1, 8], что подтверждало незначительную степень отклонений от среднего арифметического и высокую степень достоверности результатов внутри каждой выборки.

Проведя сравнительный анализ данных, полученных при оценке прецизионности методики, выявили, что в условиях сходимости степень достоверности результатов определения биологической активности ГБК выше по сравнению с оценкой, проводимой в условиях

воспроизводимости, что соответствовало общепринятым ожиданиям в статистике [1]. При этом по всем абсолютным и относительным показателям вариации методика удовлетворяла критериям приемлемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка основных валидационных характеристик методики определения биологической активности и наличия/отсутствия токсичности гидролизата белков крови для применения в анализе сырья при изготовлении противоящурных вакцин.

При использовании ГБК, не проявляющих токсичность, в концентрациях 0,25 и 0,50% интенсивность прироста клеток линии ВНК-21 составляла >3,0, что соответствовало требованиям разработанной методики. При исследовании 560 проб ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50% с применением разработанной методики выявили, что при использовании гидролизата с содержанием 0,25% уровень значимости критерия Фишера со-

Таблица 3
Оценка чувствительности тест-системы для определения биологической активности ГБК (546 проб, n = 3)

Кратность прироста			Доля живых клеток в суспензии, %					
ожидаемый результат	фактический результат		ожидаемый результат	фактический результат				
	3,0–4,5	4,5–5,0		95–100	90–95	60–90	<60	
>3,0	131	415	1–3-й пассажи	98–100	302	125	119	0
			4–5-й пассажи	>60	235	177	134	0

Таблица 4

Оценка прецизионности методики определения биологической активности ГБК в условиях сходимости при исследовании в 3 пассажах ($n = 3$)

№ п/п	Характеристика исследуемого образца	Статистические показатели								
		Наибольшее значение ($K_{\text{пр}}^{\text{max}}$)	Наименьшее значение ($K_{\text{пр}}^{\text{min}}$)	Размах вариации (R)	Среднее линейное отклонение ($d_{\text{л}}^{\text{ср}}$)	Дисперсия (δ^2)	Среднее квадратичное отклонение (δ)	Коэффициент осцилляции ($V_{\text{р}}\%$)	Линейный коэффициент вариации ($C_{\text{л}}\%$)	Коэффициент вариации ($C_{\text{р}}\%$)
1	ГБК серия № 6, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	5,1	5,0	0,1	0,044	0,002	0,047	1,974	0,877	0,930
	2-й пассаж	5,4	5,3	0,1	0,044	0,002	0,047	1,863	0,828	0,878
	3-й пассаж	5,1	5,0	0,1	0,044	0,002	0,047	1,987	0,883	0,937
2	ГБК серия № 6, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	5,2	5,1	0,1	0,044	0,002	0,047	1,948	0,866	0,918
	2-й пассаж	5,4	5,2	0,2	0,089	0,009	0,094	3,750	1,667	1,768
	3-й пассаж	4,9	4,8	0,1	0,044	0,003	0,047	2,055	0,913	0,969
3	ГБК серия № 53, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	4,1	4,0	0,1	0,044	0,002	0,047	2,459	1,093	1,159
	2-й пассаж	4,4	4,3	0,1	0,044	0,002	0,047	2,308	1,026	1,088
	3-й пассаж	4,4	4,2	0,2	0,067	0,007	0,082	4,651	1,550	1,899
4	ГБК серия № 53, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	4,2	4,1	0,1	0,044	0,002	0,047	2,400	1,067	1,131
	2-й пассаж	4,4	4,3	0,1	0,044	0,002	0,047	2,290	1,018	1,080
	3-й пассаж	4,3	4,2	0,1	0,044	0,002	0,047	2,362	1,050	1,114

ставлял 0,021 ($<0,05$). Иными словами, представленная модель была значима и подтверждает правильность валидируемой методики. При увеличении количества гидролизата до 0,50% представленный тест может применяться для оценки токсичности препарата путем определения процента живых клеток в суспензии.

При исследовании 546 биологически активных и удовлетворительных, а также 14 токсичных проб ГБК, проведенном с помощью валидируемой методики, подтвердили высокую чувствительность и специфичность представленной тест-системы.

При анализе прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости выявили, что полученные значения исследуемых вариационных показателей соответствуют статистическим ожиданиям относительно правильности методики и удовлетворяют критериям приемлемости.

Предложенная методика является достоверной и может быть использована для определения биологической активности и оценки токсичности ГБК при тестировании сырья для изготовления противоящурных вакцин.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1–6. – Введ. 01.11.02. – М.: Стандартиформ, 2006.
2. Государственная фармакопея РФ. Ч. 1. – 12-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. – С. 254–266.
3. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М.: Компания Спутник+, 2009. – 656 с.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
5. Международный стандарт ИСО 9000:2005. Системы менеджмента качества – Основные положения и словарь. – 3-е изд. – 2005. – URL: http://www.istu.edu/docs/education/fgos_14/ISO_9000-2005rus.pdf (дата обращения 15.01.19).
6. Методические рекомендации по определению биологической активности гидролизата белков крови: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 31.08.2018 / М. А. Шевченко, Д. В. Михалишин, М. Н. Гусева; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2018. – 30 с.
7. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. – М.: Бином, 2011. – 694 с.
8. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. – URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик-теория> (дата обращения: 12.11.18).
9. СТО 63462173-0002-2010. Гидролизат белков крови ферментативный. Технические условия. – Владимир, 2010.
10. Телишевская Л. Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / под ред. А. Н. Панина. – М.: Аграрная наука, 2000. – 295 с.

Таблица 5

Оценка прецизионности методики определения биологической активности ГБК в условиях воспроизводимости при исследовании разными операторами ($n = 3$)

№ п/п	Характеристика исследуемого образца	Статистические показатели								
		Наибольшее значение (K_{max})	Наименьшее значение (K_{min})	Размах вариации (R)	Среднее линейное отклонение (d_{cp})	Дисперсия (δ^2)	Среднее квадратичное отклонение (δ)	Коэффициент осцилляции (V_r), %	Линейный коэффициент вариации (C_v)	Коэффициент вариации (C_v), %
1	ГБК серия № 6, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	6,0	5,5	0,5	0,037	0,007	0,086	8,646	0,634	1,489
	2-й пассаж	6,0	5,5	0,4	0,030	0,005	0,071	6,897	0,517	1,219
	3-й пассаж	6,0	5,5	0,4	0,030	0,005	0,068	6,936	0,520	1,185
2	ГБК серия № 6, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	4,7	5,1	0,4	0,035	0,005	0,074	8,136	0,712	1,497
	2-й пассаж	4,7	5,0	0,4	0,027	0,005	0,068	8,054	0,537	1,375
	3-й пассаж	4,6	5,0	0,5	0,043	0,009	0,093	10,247	0,890	1,913
3	ГБК серия № 53, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	4,9	4,9	0,3	0,030	0,004	0,061	6,338	0,634	1,279
	2-й пассаж	4,5	5,0	0,5	0,060	0,011	0,107	10,453	1,150	2,234
	3-й пассаж	4,6	5,0	0,4	0,040	0,008	0,089	8,333	0,833	1,863
4	ГБК серия № 53, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	4,4	4,7	0,3	0,033	0,004	0,066	6,498	0,722	1,440
	2-й пассаж	4,3	4,7	0,4	0,040	0,007	0,082	8,824	0,882	1,801
	3-й пассаж	4,5	4,8	0,3	0,027	0,003	0,058	6,498	0,578	1,266

11. Фреши Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.

12. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases / OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). – Chapter 1.1.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf.

13. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases / OIE. – 2nd ed. – Paris: OIE, 2008. – 70 p.

REFERENCES

- GOST R ISO 5725-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results [Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij]. Parts 1–6. Introduced on 01.11.02. M.: Standartinform, 2006 (in Russian).
- The State Pharmacopoeia of the Russian Federation [Gosudarstvennaya farmakopeya RF]. Part 1. 12th ed. M.: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2008: 254–266 (in Russian).
- Animal cell in culture (methods and use in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (metody i primeneniye v biotekhnologii)]. ed. by L. P. Diakonov. M.: Kompaniya Sputnik+, 2009 (in Russian).
- Lakin G. F. Biometrics: a textbook for biological higher education institutions [Biometriya: uchebnoye posobie dlya biol. spec. vuzov]. 4th ed., revised and updated. M.: Vysshaya shkola, 1990 (in Russian).
- International standard ISO 9000:2005. Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. 3rd ed. 2005. URL: http://www.istu.edu/docs/education/fgos_14/ISO_9000-2005rus.pdf (access date 15.01.19).
- Methodological recommendations for the determination of the biological activity of blood protein hydrolysates [Metodicheskie rekomen-

dacii po opredeleniyu biologicheskoy aktivnosti gidrolizata belkov krovi]: approved by FGBI "ARRIAH" on 31.08.2018. M. A. Shevchenko, D. V. Mikhailishin, M. N. Guseva; FGBI "ARRIAH". Vladimir, 2018 (in Russian).

7. Nelson D., Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry. Vol. 2. Bioenergetics and metabolism [Osnovy biohimii Lenindzhera. T. 2. Bioenergetika i metabolism]. M.: Binom, 2011 (in Russian).

8. GMP practicum. Validation of analytical methods: theory [Praktikum po GMP. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya]. P. Nosyrev, M. Nosyreva, T. Rasskazova, N. Korneyeva. URL: <http://www.nedug.ru/news/farmaceutika/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик--теория> (access date: 12.11.18) (in Russian).

9. STO 63462173-0002-2010. Fermentative blood protein hydrolysate. Technical specification [Gidrolizat belkov krovi fermentativnyj. Tekhnicheskie usloviya]. Vladimir, 2010 (in Russian).

10. Telishevskaya L. Ya. Protein hydrolysates. Preparation, composition, uses [Belkovyye gidrolizaty. Poluchenie, sostav, primeneniye]. ed. by A. N. Pannin. M.: Agrarnaya nauka, 2000 (in Russian).

11. Freshney R. Ya. Culture of animal cells. A practical guide [Kul'tura zhivotnykh kletok. Prakticheskoe rukovodstvo]. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2011 (in Russian).

12. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 1.1.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf.

13. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. OIE. 2nd ed. Paris: OIE, 2008.

Поступила 31.01.19

Принята в печать 20.02.19

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

В. С. Русалеев¹, О. В. Прунтова², Д. А. Васильев³

¹ Ученый секретарь, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: rusaleev@arriah.ru

² Главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ Заведующий кафедрой, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина», г. Ульяновск, Россия, e-mail: dav_ul@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В ветеринарной практике в течение последних 20 лет наблюдают снижение лечебного действия некоторых препаратов на основе живых лакто- и бифидобактерий, что стимулирует ученых к поиску новых микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами. Много исследований в этом плане посвящено *Bacillus subtilis*, которая широко распространена в природе и непатогенна для животных и людей. Представлены результаты изучения биологических свойств и антагонистической активности *Bacillus subtilis*, которое было проведено с целью отработки методических подходов к выявлению штаммов с максимальной антагонистической активностью относительно некоторых видов условно-патогенных микроорганизмов и их дальнейшего использования в качестве пробиотических препаратов. По культурально-морфологическим и биохимическим характеристикам изученные штаммы бактерий соответствовали видовым признакам *Bacillus subtilis* и для белых мышей были непатогенны. Эксперименты показали, что получение споровой биомассы возможно как в жидкой, так и на плотной питательных средах. В методическом плане наработка споровой биомассы в жидкой питательной

среде более предпочтительна. Проведенные исследования выявили неоднородность спор при выходе их из состояния анабиоза, которая зависела от сроков хранения исходных спор посевного материала. Быстрее из состояния анабиоза выходили споровые культуры, хранившиеся до одного года. Установлено, что процесс спорообразования эффективнее проходит в условиях аэрации культуры кислородом, также выявлено стимулирующее влияние культуральной жидкости из лаг-фазы на процесс прорастания спор *Bacillus subtilis*. В результате проведенных экспериментов установлена антагонистическая активность штаммов *Bacillus subtilis* по отношению к кишечной палочке, сальмонеллам и стафилококку. Зона торможения роста этих культур составляла от 15 до 20 мм. Изученные штаммы *Bacillus subtilis* могут быть предложены для использования в качестве пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотики, *Bacillus subtilis*, культурально-морфологические свойства, биохимические свойства, спорообразование, антагонистическая активность.

UDC 619:579.852.11:616-08

CULTURAL MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS

V. S. Rusaleev¹, O. V. Pruntova², D. A. Vasilyev³

¹ Academic Secretary, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: rusaleev@arriah.ru

² Chief Expert, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: pruntova@arriah.ru

³ Head of Chair, Doctor of Science (Biology), FSFHEI "Ulyanovsk State Agrarian University named after P. A. Stolypin", Ulyanovsk, Russia, e-mail: dav_ul@mail.ru

SUMMARY

A decrease in therapeutic effect of some live lacto- and bifidobacteria-based drugs for veterinary use has been observed for the last 20 years that urges scientists to search for new microorganisms possessing probiotic properties. Many studies in this field are focused on *Bacillus subtilis* that is widespread in the environment and non-pathogenic for animals and humans. Results of tests of *Bacillus subtilis* for its biological properties and antagonistic activity aimed at optimization of methodical approaches for detection of strain with the highest antagonistic effect on some opportunistic microorganisms and their further use as probiotics are described. Cultural morphological and biochemical characteristics of the tested strains conformed to the species characteristics of *Bacillus subtilis*. Tested strains were non-pathogenic for white mice. Tests showed that spore biomass could be prepared both in liquid and on solid nutrient media. Methodically, spore biomass preparation in

liquid nutrient medium is preferable. The tests showed that spores emerged from anabiosis non-uniformly and it depended on original seed spore storage period. Spore cultures stored less than one year emerged from anabiosis more quickly. It was found that the spores formed more readily when the cultures were aerated with oxygen as well as that lag-phase culture medium had a stimulating effect on *Bacillus subtilis* spore germination. *Bacillus subtilis* strains were found to have antagonistic effect on *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus*. Area of growth inhibition of the said bacteria was 15–20 mm. Tested *Bacillus subtilis* strains could be proposed for use as probiotics.

Key words: probiotics *Bacillus subtilis*, cultural and morphological properties, biochemical properties, spore formation, antagonistic activity.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из проявлений взаимоотношений микроорганизмов в природе является их антагонизм, заключающийся в том, что при совместном развитии бактерии одного вида угнетают жизнедеятельность бактерий другого вида. Данное свойство бактерий получило практическое применение в ветеринарии за счет их использования в качестве пробиотиков.

Необходимо отметить, что широкое использование в ветеринарной и медицинской практике последних десятилетий различных пробиотических препаратов из живых лакто- и бифидобактерий привело к снижению их лечебного действия и подтолкнуло ученых к поиску новых, более эффективных микроорганизмов с пробиотическими свойствами. Одними из наиболее подходящих в этом плане биологических объектов являются некоторые виды спорообразующих бактерий, и в первую очередь *Bacillus subtilis* [2, 3]. В настоящее время на их основе в мире создано более 50 различных споровых пробиотических препаратов. При совместном развитии *Bacillus subtilis* с бактериями других видов антагонистическая активность бацилл определяет выживание микроорганизмов при их взаимодействии в бактериальных ассоциациях. *Bacillus subtilis* образуют антибиотические вещества и за счет этого оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие на другие микроорганизмы. Сенная палочка может эффективно подавлять рост различных условно-патогенных бактерий, таких как кишечная палочка, стрептококки, стафилококки и другие. Антагонизм *Bacillus subtilis* в отношении значительного количества микроорганизмов открывает широкие перспективы по созданию на их основе новых лечебно-профилактических препаратов для животных. Следует отметить, что положительные пробиотические качества культур *Bacillus subtilis* свойственны не для каждого штамма [6, 8]. В основу пробиотических препаратов многих торговых марок заложены различные штаммы *Bacillus subtilis*. Механизм пробиотического действия препаратов на основе различных видов бацилл подробно описан в литературе [1, 7].

Целью данной работы было изучение биологических свойств некоторых штаммов *Bacillus subtilis*, их антагонистической активности, процесса спорообразования и получения биомассы спор как один из первых этапов работы по поиску возможного претендента на роль пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штамм *Bacillus subtilis* № 1232, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ им. П. А. Столыпина, а в качестве контрольного служил референтный штамм ATCC 6633.

Питательные среды. В исследовании использовали мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730-75, жидкую споруляционно-ростовую среду [5], 2%-й мясопептонный агар (МПА), 2%-й картофельно-пептонный агар, среды Гисса, а также деминерализованную воду.

Морфологию и тинкториальные свойства бактерий изучали под микроскопом в фазовом контрасте и путем окраски вегетативных клеток по Граму. Подвижность бактерий определяли методом раздавленной капли, используя 5- и 16–18-часовые бульонные культуры.

Культуральные свойства изучали по характеру роста в жидких и на плотных питательных средах.

Биохимические свойства культур не старше 18–20 ч, выросших на плотной питательной среде и средах Гисса, определяли с помощью систем индикаторных булавочных (СИБ) для идентификации микроорганизмов и бактериологического анализатора VITEK® 2 Compact с использованием идентификационных карт GN и GP, а также карт для выявления антибактериальной чувствительности микроорганизмов.

Посевы бактерий на среды Гисса выдерживали в течение 2 сут при 35–37 °С. Наличие или отсутствие ферментации углеводов определяли по изменению окраски среды.

Гемолитическую активность бактерий изучали на МПА, содержащем 5% свежей дефибрированной крови барана.

Образование индола и сероводорода определяли с помощью индикаторной бумаги, помещенной под пробку пробирки с МПБ.

Редуцию нитратов выявляли после роста культуры в течение 48 ч на бульоне с нитратами (KNO₃). В каждую пробирку с засеянным нитратным бульоном добавляли по 1 см³ реактива (равная смесь 10%-й химически чистой серной кислоты и раствора из 1%-го растворимого крахмала и 0,5%-го йодистого калия).

Гидролиз казеина изучали на молочном агаре. Культуру засеивали на среду штрихом, инкубировали в термостате при 37 °С, затем наблюдали за появлением прозрачных зон гидролиза.

Гидролиз крахмала исследовали на картофельно-пептонном агаре. Чашки Петри с засеянным агаром через 48 ч инкубирования, проведенного при 37 °С, заливали раствором Люголя. Светлые зоны вокруг посевов свидетельствовали о гидролизе крахмала.

При выращивании бактерий *Bacillus subtilis* в жидкой питательной среде отмечали интенсивность роста и характер помутнения среды.

Контроль чистоты роста осуществляли посредством микроскопии окрашенных мазков. Световую микроскопию мазков, окрашенных по Граму или контрастированных насыщенным спиртовым раствором фуксина (на наличие спор), проводили под микроскопом МБИ-15 при увеличении в 900 раз.

Расчет концентрации жизнеспособных спор проводили по формуле:

$$C = \frac{\bar{N}_n + \bar{N}_{n+1}}{1,1} \times \frac{1}{V} \times 10^n,$$

где C – число жизнеспособных спор в 1 см³ споровой суспензии;

$\bar{N}_n$ – среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при посеве из разведения 10⁻ⁿ;

$\bar{N}_{n+1}$ – среднее арифметическое число колоний, выросших в чашках при посеве из разведения 10⁻⁽ⁿ⁺¹⁾;

1,1 – постоянный коэффициент;

V – объем споровой суспензии, высеваемой на чашки;

10ⁿ – разведение споровой суспензии, используемое при определении количества жизнеспособных спор.

Антагонистическую активность *Bacillus subtilis* оценивали *in vitro* методом агаровых слоев, основанном на диффузии синтезируемых бациллами антимикробных веществ в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру, и подавлении роста последней. В качестве тест-культур служили *Escherichia coli* б/н,

Salmonella cholerae suis штамма № 370, *Staphylococcus aureus* б/н. Для оценки антагонистической активности *Bacillus subtilis* в чашки Петри с 2%-м МПА наслаивали сверху 0,7% МПА. Предварительно этот агар расплавили, охлаждали до 46–48 °С, вносили соответствующую тест-культуру и после перемешивания наносили на 2%-й МПА, равномерно распределяя по поверхности. После 16–18-часового подращивания при 35–37 °С на поверхность полужидкого агара бактериологической петлей наносили каплю исследуемого штамма *Bacillus subtilis*. Учет результатов осуществляли через 16–18 ч инкубирования при 35–37 °С по размеру зон отсутствия роста тест-культур вокруг исследуемого штамма *Bacillus subtilis*.

Патогенные свойства определяли на беспородных белых мышах массой 16 г, которым внутрибрюшинно вводили по 0,5 см³ бульонной культуры *Bacillus subtilis* с концентрацией $\times 10^9$ клеток в см³. Наблюдение за животными вели в течение 10 сут.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами

по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2012 г. по охране животных, используемых в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая серия экспериментов заключалась в определении культурально-морфологических и биохимических свойств *Bacillus subtilis*. Для этого исследуемые штаммы бактерий в объеме 0,1–0,2 см³ засеивали на твердые и в жидкие питательные среды, а также среды Гисса. Посевной материал равномерно распределяли по поверхности МПА путем покачивания, чашки Петри подсушивали 30–40 мин при комнатной температуре, переносили в термостат и инкубировали вверх дном при температуре 35–37 °С в течение 20–24 ч. Посевы в жидкой питательной среде культивировали в этом же режиме.

В посевах на МПБ наблюдали характерный для *Bacillus subtilis* рост культуры, сопровождающийся помутнением среды и образованием трудно разбивающейся пленки серовато-белого цвета на поверхности бульона.

На поверхности МПА после суточной инкубации наблюдали серовато-белые бугристые колонии с неровными краями (рис. 1) вязкой консистенции. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали грамположительные цепочки и палочки диаметром около 0,6 мкм и длиной 3–5 мкм (рис. 2).

В препаратах, приготовленных по методу раздавленной капли, клетки, благодаря своим жгутикам, были подвижны.

Изучение биохимических свойств исследуемых штаммов показало, что бактерии ферментируют сахарозу, глюкозу, манит, салицин, эскулин, фруктозу и не ферментируют лактозу, мальтозу, рамнозу, дульцит, инозит, сорбит, галактозу, раффинозу.

Бактерии не образуют индол, но образуют сероводород, гидролизуют крахмал, казеин, но не гидролизуют тирозин и не гемолизуют эритроциты барана, редуцируют нитраты и продуцируют каталазу.

Для подтверждения способности изучаемых культур к спорообразованию суточную бульонную культуру в объеме 0,3–0,5 см³ высевали на чашки Петри с картофельно-пептонным агаром, равномерно распределяя посевной материал по поверхности агара путем покачивания. Посевы подсушивали в термостате при 35–37 °С в течение 20–30 мин, переворачивали крышкой вниз и инкубировали в течение 6–7 сут. Выборочная микроскопия мазков из культур, выросших в препарате «раздавленная капля» и контрастированных фуксином (рис. 3), показала наличие спор овальной формы, размером 0,8×0,6 мкм, расположенных в клетке центрально.

Антагонистическую активность бактерий *Bacillus subtilis* исследовали на питательных средах по отношению к *Escherichia coli* б/н, *Salmonella cholerae suis* штамма № 370, *Staphylococcus aureus* б/н. Проведенные опыты показали наличие зон торможения роста использованных тест-культур от 15 до 20 мм.

Исследуемые штаммы *Bacillus subtilis* для белых мышей были непатогенны.



Рис. 1. Морфология колоний *Bacillus subtilis* штамма № 1232 через 24 ч инкубации на МПА ($\times 10$)



Рис. 2. Морфология клеток *Bacillus subtilis* штамма № 1232 через 24 ч инкубации на МПА (окраска по Граму, $\times 900$)

Вторая серия экспериментов была посвящена получению биомассы спор и определению их жизнеспособности. Нарработку биомассы спор проводили как на плотной, так и в жидкой питательной среде.

Для получения спор суточную бульонную культуру *Bacillus subtilis* в объеме 0,3–0,5 см³ засеивали на чашки с картофельно-пептонным агаром. Посевы инкубировали в течение 6–7 сут. Процент спорообразования определяли путем выборочной микроскопии мазков из чашек в препарате «раздавленная капля». При просмотре 3–5 полей зрения мазка и обнаружении не более 15–20 вегетативных форм на 80–100 спор, производили смыв спор с поверхности картофельно-пептонного агара стерильной деминерализованной водой. Лизис остаточных количеств вегетативных клеток *Bacillus subtilis* производили прогреванием споровой суспензии на водяной бане при температуре 80 °C в течение 30–40 мин. Споры дважды отмывали от остатков питательной среды стерильной деминерализованной водой путем центрифугирования в течение 20–30 мин при 4–5 тыс. об/мин и последующего ресуспендирования.

Определение количества жизнеспособных спор проводили на МПА. Для этого расплавленный и охлажденный до температуры 45–50 °C МПА разливали по 15–20 см³ в стерильные чашки Петри. Исследуемую споровую культуру тщательно встряхивали и готовили ее 10-кратные разведения (с 10⁻¹ до 10⁻⁸) на стерильной деминерализованной воде с добавлением Твина-80 (на 100 см³ воды 2 капли Твина). Для каждого разведения использовали отдельную пипетку. Разведения выдерживали при комнатной температуре в течение 15–20 мин.

После тщательного перемешивания из двух последних разведений споровой суспензии (10⁻⁷ и 10⁻⁸), начиная с последнего, стерильной микропипеткой делали высевы в чашки Петри с МПА, используя для каждого разведения отдельную пипетку. Из каждого разведения высевы производили на три чашки с МПА, внося в каждую по 0,1 см³ суспензии. После равномерного распределения путем покачивания посевного материала по поверхности МПА чашки Петри подсушивали 30–40 мин при комнатной температуре, переносили в термостат, ставя крышкой вниз, и инкубировали в течение 20–24 ч при температуре 35–37 °C.

По истечении указанного времени проводили визуально подсчет колоний, выросших на МПА в каждой чашке Петри, находили среднее арифметическое число колоний каждого разведения споровой суспензии.

При получении биомассы спор *Bacillus subtilis* в жидкой питательной среде культивирование проводили в 2-литровых колбах, содержащих 300 мл жидкой споруляционно-ростовой питательной среды, при 35–37 °C на качалке (120 об/мин). Через 24 ч культивирования споры собирали и отмывали стерильной деминерализованной водой с помощью центрифугирования при 10 000 г 15 мин.

Число жизнеспособных клеток определяли путем подсчета колоний, образовавшихся после посева спорных суспензий на МПА.

Микроскопическое исследование процессов прорастания спор культуры *Bacillus subtilis* выявило гетерогенность выхода их из состояния анабиоза. Гетерогенность спор в отношении прорастания менялась в зависимости от сроков хранения исходных спор посевного материала.

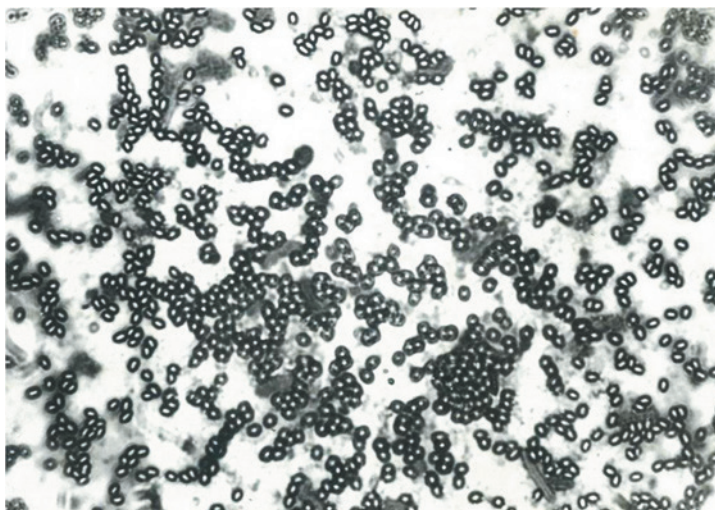


Рис. 3. Спорообразование *Bacillus subtilis* штамма № 1232 через 4 сут инкубации при 35 °C на картофельно-пептонном агаре (контрастирование фуксином, $\times 900$)

ла. Быстрее из состояния анабиоза выходили споровые культуры, хранившиеся до одного года.

Учитывая, что на процесс прорастания спор бацилл существенно влияет количество кислорода в питательной среде [4], во всех сериях экспериментов использовали питательную среду одного и того же состава. Режим культивирования с шутелированием обеспечивал степень аэрации культуры кислородом на 75–85%.

Примененный режим аэрации гарантировал 80–95%-ю инициацию спор через 10 мин с момента их инокулирования в питательную среду. По-видимому, наличие в питательной среде кислорода способствует более быстрому протеканию в спорах процессов, приводящих к выходу из состояния анабиоза.

В заключительной части экспериментов изучали влияние культуральной жидкости на процесс прорастания спор. Культивирование осуществляли в стационарных условиях. Подсчет прорастающих спор в контрольных и опытных пробах проводили через каждые 15 мин с момента их инокулирования в питательную среду. Оценку проводили микроскопическим методом и по изменению оптической плотности. Эксперименты показали, что через 45 мин количество проросших спор увеличилось до 90% в сравнении с 25–30% в контроле. В ходе экспериментов был выявлен стимулирующий эффект культуральной жидкости из лаг-фазы на процесс прорастания. Это же явление наблюдали и при высеве обработанных покоящихся спор *Bacillus subtilis* на плотные питательные среды. При этом отмечали увеличение числа выросших колоний по сравнению с контрольными пробами на 50–60%. По-видимому, в данном случае происходит инициация сверхпокоящихся спор, не прорастающих без предварительной активации.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, указывающими на необходимость термоактивации для прорастания части споровой популяции *Bacillus subtilis*, находящихся в состоянии глубокого анабиоза [4].

Можно предположить, что стимуляция проявляется не в сокращении времени основных стадий прорастания, а в увеличении числа вышедших из состояния анабиоза и проросших спор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штаммы *Bacillus subtilis* № 1232 и ATCC 6633 по культурально-морфологическим и биохимическим признакам соответствуют видовым характеристикам.

Методические подходы, использованные в работе, позволяют получить споры *Bacillus subtilis* как в жидкой, так и на плотной питательной среде.

Изученный штамм № 1232 *Bacillus subtilis* проявлял антагонистическую активность в отношении всех трех видов испытанных бактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella cholerae suis* и *Staphylococcus aureus* – и может быть предложен как кандидат для использования в качестве пробиотика.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–192. – URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29324>.
2. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3 (32–33). – С. 20–41.
3. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадиева, М. Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2017. – Т. 159, № 1. – С. 85–107.
4. Пронин С. В. Роль молекулярного кислорода и энергетического метаболизма в начале прорастания спор *Bacillus cereus* // Микробиология. – 1987. – Т. 56, № 4. – С. 558–563.
5. Способ изготовления вакцины против сибирской язвы животных: пат. 2095409 Российская Федерация МПК C12N1/20; C12N3/00; A61K39/07; C12N1/20; C12R1:07 / В. А. Гаврилов, Ю. В. Числов, Л. Ф. Николайчук; ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. – № 95111037/13; заявл. 27.06.95; опубл. 10.11.97.
6. Hosoi T., Kiuchi K. Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) // Handbook of Fermented Functional Foods / ed. E. R. Farnworth. – Boca Raton: CRC Press, 2003. – P. 227–250.

7. Patel R., DuPont H. L. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics // Clin. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 60, Suppl. 2. – P. S108–S121; DOI: 10.1093/cid/civ177.

8. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens / K. Bai, Q. Huang, J. Zhang [et al.] // Poult. Sci. – 2017. – Vol. 96 (1). – P. 74–82; DOI: 10.3382/ps/pew246.

REFERENCES

1. New generation of feed probiotics [Novoe pokolenie probioticheskikh preparatov kormovogo naznacheniya]. N. A. Ushakova, R. V. Nekrasov, V. G. Pravdin [et al.]. *Fundamental Research*. 2012; 1: 184–192; URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29324> (in Russian).
2. Pokhilenko V. D., Perelygin V. V. Spore-forming bacteria-based probiotics and their safety [Probiotiki na osnove sporoobrazuyushchih bakterij i ih bezopasnost']. *Himicheskaya i biologicheskaya bezopasnost'*. 2007; 2–3 (32–33): 20–41 (in Russian).
3. Probiotics based on *Bacillus* spp. bacteria in poultry industry [Probiotiki na osnove bakterij roda *Bacillus* v pticevodstve]. N. V. Feoktistova, A. M. Mardanova, G. F. Khadiyeva, M. R. Sharipova. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2017; 159 (1): 85–107 (in Russian).
4. Pronin S. V. Role of molecular oxygen and energy metabolism at the onset stage of *Bacillus cereus* spore germination [Rol' molekulyarnogo kisloroda i ehnergeticheskogo metabolizma v nachale prorastaniya spor *Bacillus cereus*]. *Microbiology*. 1987; 56 (4): 558–563 (in Russian).
5. Method for preparation of vaccine against anthrax in animals [Sposob izgotovleniya vakciny protiv sibirskoy yazvy zhivotnyh]: pat. 2095409 Russian Federation MПК C12N1/20; C12N3/00; A61K39/07; C12N1/20; C12R1:07. V. A. Gavrilov, Yu. V. Chislov, L. F. Nickolaychuk; SSI "VNIIVViM" of the Russian Agricultural Academy. No. 95111037/13; applic. 27.06.95; published on 10.11.97 (in Russian).
6. Hosoi T., Kiuchi K. Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). *Handbook of Fermented Functional Foods*. ed. E. R. Farnworth. Boca Raton: CRC Press, 2003: 227–250.
7. Patel R., DuPont H. L. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60 (Suppl. 2): S108–S121; DOI: 10.1093/cid/civ177.
8. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. K. Bai, Q. Huang, J. Zhang [et al.]. *Poult. Sci.* 2017; 96 (1): 74–82; DOI: 10.3382/ps/pew246.

Поступила 13.12.18
Принята в печать 22.02.19

ГЛОБАЛЬНАЯ ЭПИЗООТОЛОГИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ.

2. ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЧЕЛОВЕКА КАК ИНДИКАТОР ЭПИЗООТИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ И ФАКТОРЫ РИСКА

В. В. Макаров¹, Н. Я. Махамат²

¹ Доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва, Россия, e-mail: vvm-39@mail.ru

² Аспирант, Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва, Россия, e-mail: mhtnquerabe@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Настоящее исследование посвящено оценке предполагаемых ассоциаций между эпизоотической и эпидемической составляющими ветеринарной эпидемиологии сибирской язвы животных и человека, а также оценке факторов эпидемического риска. Согласно анализу доступных статистических сведений международной информационной базы данных ProMED за период с 2007 по 2017 г., регионы Африки, Азии и Ближнего Востока являются стационарно неблагополучными по сибирской язве человека с индексами эпидемичности 1,0. Заболеваемость очень редко регистрируется в Европе и эксквизитно – в США и Южной Америке. Суммарная заболеваемость на протяжении анализируемого периода составила более 3700 человек, в среднем 340 ежегодно, с лимитами от min 81 до max 856. Суммарная смертность – 234, среднегодовая – 21 с лимитами от min 6 до max 58, летальность (% смертности в числе больных) среднегодовая – 9,8 с лимитами от min 3,3 до max 39,5. Для оценки реальной связи заболеваемости человека и смертности животных как основных признаков эпидемической и эпизоотической составляющих ветеринарной эпидемиологии сибирской язвы проведено сопоставление выборки погодовой статистики проявления инфекции в ряде стран Африки, Азии и Ближнего Востока и Европы с наибольшим эпизоотическим и эпидемическим неблагополучием. На основе проведенного анализа статистической связи между зарегистрированной инцидентностью среди животных и людей не выявлено. Существенная доля заболеваемости человека обусловлена неустановленными источниками инфекции. Среди тривиальных факторов зоогенного риска заболеваемости человека преобладающее значение имеет употребление в пищу инфицированных продуктов от домашних (до 70%) и диких животных, а летальности – потребление мяса домашних животных и контакты с больными животными. Полученные результаты свидетельствуют о многочисленных невыясненных аспектах ветеринарной эпидемиологии сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, эпизоотология, эпидемиология, факторы риска.

UDC 619:616.98:579.852.11

ANTHRAX GLOBAL EPIZOOTOLOGY.

2. DISEASE INCIDENCE IN HUMANS AS INDICATOR OF EPIZOOTIC AND RISK FACTORS

V. V. Makarov¹, N. Ya. Makhamat²

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

² Post-Graduate Student, People's Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, Russia, e-mail: mhtnquerabe@mail.ru

SUMMARY

The paper deals with the assessment of the implied associations between the epizootic and epidemic components of the veterinary anthrax epidemiology of animals and humans, as well as with the epidemic risk factors. Analysis of the statistical data for 2007–2017, available in ProMED international database, demonstrated that African, Asian and Near Eastern regions are permanently infected with human anthrax at the incidence rate of 1.0. The disease is very rarely reported in Europe, and it is exotic in the USA and South America. During the study period, the overall incidence amounted to over 3,700 humans: at an average of 340 humans annually ranging from min 81 to max 856. Total mortality amounted to 234 humans with average annual mortality of 21 humans ranging from min 6 to max 58, average annual lethality (patients' mortality %) – 9.8 ranging from min 3.3 to max 39.5. For the assessment of the genuine interrelation of the incidence in humans and mortality in animals, we compared the statistic samples of the annual infection incidence in a number of the most epidemically and epizootically affected African, Asian and Near Eastern countries as the basic features of the epidemic and epizootic components of the veterinary anthrax epidemiology. The analysis demonstrated no statistical relation between the reported disease incidence in animals and humans. Substantial share of the disease incidence in humans is accounted for unidentified sources of the infection. Consumption of infected products from domestic (up to 70%) and wild animals prevails among the trivial risk factors of zoonogenous infection in humans, while consumption of meat from domestic animals and contacts with diseased animals prevail among the lethality risk factors. The obtained results are indicative of multiple unidentified aspects of veterinary anthrax epidemiology.

Key words: anthrax, epizootology, epidemiology, risk factors.

ВВЕДЕНИЕ

Наука и практика зоонозов – болезней, общих для животных и человека в естественных условиях, – основывается на разнообразных ассоциациях их эпизоотических и эпидемических составляющих. Роль заболеваемости сибирской язвой человека в реальной ветеринарной эпидемиологии и значение в контексте эпизоотического процесса слабо освещены в научной литературе в целом, а в отечественной ветеринарной науке доступных сведений по этому аспекту нет. В принципе вектор исследований и результаты в эпидемиологии имеют односторонний характер «от животных к человеку» при отсутствии попыток оценить факты в обратном направлении¹.

Известно, что основные причины и пути естественного возникновения сибирской язвы человека – прямой или косвенный контакты с инфицированными животными или объектами животного происхождения (обслуживание, убой, разделка туш, потребление, различные профессиональные действия, в частности, кожевенное и шерстное производство). Внезоогенная спонтанная заболеваемость людей на протяжении обозреваемой естественной истории сибирской язвы практически неизвестна², больной человек источником инфекции не является. Различные формы течения инфекции у человека, в отличие от животных, определяются способами заражения и клинического проявления – кожная (локальная) при поверхностной аппликации возбудителя, ингаляционная и кишечная (генерализованные).

Принято считать, что частота спонтанной заболеваемости людей зависит от уровня эпизоотического неблагополучия для каждой отдельной страны с учетом национальных данных о поголовье восприимчивых животных и всей совокупности эпизоотических и эпидемических кофакторов. Статистический анализ многолетней глобальной заболеваемости животных и человека показывает определенные средневзвешенные соотношения. В частности, 95% случаев сибирской язвы человека приходится на кожную форму, на один случай заболевания человека кожной формой приходится 10 убитых и переработанных инфицированных животных, на каждые 150 кожных форм – одна генерализованная [5, 8, 11, 12].

Однако эти показатели оказываются достаточно условными и вариабельными. Они могут иметь обратное значение в сельских регионах мира с высоким уровнем бедности населения, недостатком питания, слабым ветеринарным и санитарно-эпидемиологическим надзором, в целом низким экономическим и социально-культурным статусом (Чад, Эфиопия, Замбия, Зимбабве в Африке, Индия, Средняя Азия, юг и Заполярье РФ и др.), где гастрономические привычки допускают употребление в пищу мяса от больных, погибающих и даже павших животных, а сырье идет на обработку и в торговлю³. Здесь

на каждое сибиреязвенное животное, убитое и использованное в потребительских целях, может приходиться 10 и более случаев заболевания людей кожной и кишечной формами сибирской язвы. Например, в Гаити довольно распространенной является кожная форма сибирской язвы человека, но регистрация заболеваемости животных практически отсутствует [11, 12, 13].

Вместе с тем крайне редки случаи сибирской язвы кишечной формы там, где местные традиции предполагают кулинарное термическое приготовление мяса (варку) задолго до потребления (Гаити, Казахстан). Напротив, привычки сельских жителей некоторых регионов Африки (к югу от Сахары) и Азии (Таиланд, Корея) потреблять недоваренное мясо и приготовленные без термической обработки продукты (соленые, копченые, маринованные, сушеные, строганина) способствуют заражению в случаях, когда потребность в пище перевешивает риски заболевания [11, 13].

Отмечено, что, несмотря на каноническую смертельность сибирской язвы, в таких условиях данные формы заболевания у человека зачастую протекают без особой злокачественности, субклинически и с приобретением иммунитета. Именно приобретенная устойчивость, нередко массовая, поддерживает мнение маргинальных слоев скотоводческого населения о безопасности использования продуктов от больных животных без специального обезвреживания [11, 12, 13].

Целью настоящей работы является оценка предполагаемых ветеринарно-эпидемиологических ассоциаций между сибирской язвой животных и человека, а также некоторых факторов эпидемического риска на основе анализа доступных статистических сведений международной информационной базы данных ProMED⁴ за период с 2007 по 2017 г. [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в формате систематического обзора, обобщения и анализа имеющихся сведений по ветеринарной эпидемиологии сибирской язвы за 2007–2017 гг. Источниками информации, помимо базы данных ProMED [14], послужили некоторые современные отечественные и зарубежные публикации и научные издания [2, 4, 7, 8, 11].

Использованные в качестве методической основы принципы и приемы дескриптивной эпизоотологии в работе со статистическим материалом по сибирской язве относительно расчетов количественных характеристик, графических построений и иных аналитических элементов заимствованы из обобщенного и издан-

¹ По данным eLIBRARY.

² В последние годы стали известны факты спонтанного заражения сибирской язвой «не естественного», экстремального характера и смертности людей от нее, имеющие скорее социальную, чем зоонотическую природу, – использование контаминированных спорами предметов из животного сырья, изготовленных в Африке (кожи барабанов), и героина среди наркоманов [2, 9].

³ Примером подобных действий скотоводов могут послужить факты из реальной жизни, описанные в великолепной книге «Воспоминания и размышления ветеринарного врача» Павла Петровича Рахманина (2018), долгое время работавшего в Таджикистане.

⁴ ProMED (Program for Monitoring Emerging Diseases, Программа мониторинга эмерджентных болезней) – интернет-система эпидемиологического наблюдения, созданная в 1994 г. С 1999 г. является официальным органом крупнейшей профессиональной организации – Международного общества по инфекционным заболеваниям (International Society for Infectious Diseases). Предназначена для быстрого ежедневного сбора сведений о возникновении внезапных новых острых вспышек опасных инфекционных заболеваний и иных явлений патологического и поражающего характера, представляющих эмерджентную угрозу здоровью людей, животных, растений в глобальном масштабе, и распространении информации о них с помощью электронных связей в заинтересованных кругах с целью своевременного реагирования в соответствии с принципом «предупрежден – значит защищен». Материалы программы безотлагательно размещаются в электронном формате на веб-сайте ProMED-mail на всех преобладающих языках мира (включая русский) [14].

ного кафедрой ветеринарной патологии РУДН пособия «Эпизоотологический метод исследования» [10], из современных руководств по общей эпидемиологии и доказательной медицине [1, 6], биометрические подходы и методы – из пособия «Биометрия» [3]. В необходимых случаях пояснения методического характера даются по тексту изложения полученных результатов.

В работе приняты следующие базовые элементы понятия аппарата.

Индекс эпидемичности – ретроспективный показатель напряженности эпидемической ситуации в многолетней динамике. Выражается отношением числа лет, в течение которых регистрировалась заболеваемость, к общему числу лет за изучаемый период (обычно за 10 и более лет):

$$X = \frac{\text{(число лет с регистрируемой заболеваемостью)}}{\text{(общее число лет за изучаемый период)}}.$$

Сопряженность эпизоотичности/эпидемичности сибирской язвы – одновременное, статистически совпадающее годовое неблагополучие по сибирской язве животных и человека. **Индекс сопряженности** выражается отношением числа лет, в течение которых одно-

временно регистрировалась сибирская язва животных и человека, к общему числу неблагополучных лет за изучаемый период:

$$X = \frac{\text{(число лет с одновременной регистрацией заболеваемости животных и человека)}}{\text{общее число неблагополучных лет за изучаемый период}}.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В самом общем представлении, согласно анализу статистических данных [2, 3, 7, 8, 11, 14], регионы Африки, Азии и Ближнего Востока стационарно неблагополучны по сибирской язве человека с индексами эпидемичности 1,0. Заболеваемость очень редко регистрируется в Европе и эксквизитно – в США и Южной Америке. Суммарная заболеваемость на протяжении контролируемого периода составила более 3700 человек, в среднем 340 ежегодно, с лимитами от min 81 до max 856. Суммарная смертность – 234, среднегодовая – 21 с лимитами от min 6 до max 58, летальность (% смертности в числе больных) среднегодовая – 9,8 с лимитами от min 3,3 до max 39,5.

Таблица

Обобщенная характеристика эпизоотичности/эпидемичности сибирской язвы по данным, зарегистрированным в регионах и странах с наибольшим неблагополучием

Критерии	Африка	Азия	Европа
Страны с высокой инцидентностью	Гвинея, Замбия, Зимбабве, Кения, Намибия	Израиль, Индия, Индонезия, Китай, Монголия	Великобритания, Германия, Италия, Франция, Швеция, Грузия, Армения
Число стран с высокой инцидентностью	5	5	7
Индексы эпизоотичности	0,36	0,42	0,22
Индексы эпидемичности	0,40	0,50	0,19
Σ смертности животных	999	1131	340
Σ заболеваемости людей	878	486	189*
Лимиты инцидентности min–max: животные	51–508	73–535	14–69
человек	41–369	3–298	1–57
Количество кластеров	55	55	77
Σ неблагополучных кластеров	31	31	29
Σ сопряженных кластеров	12	14	2
Индексы сопряженности	0,39	0,45	0,07
Δ отношений инцидентности «животные/человек», лимиты min–max	1,37 0,64–2,78	2,3 1,79–2,85	1,8 –
Инцидентность сибирской язвы человека без регистрации у животных: количество стран	5	4	3
количество кластеров (%)	13 (42)	8 (26)	13 (45)
Σ количества случаев (%)	386 (44)	68 (14)	183* (97)

Σ – сумма ряда значений (смертность, заболеваемость и др.);

Δ – средняя величина ряда значений;

* с учетом десятков случаев заражения от контаминированного спорами сибирской язвы героина [2, 9].

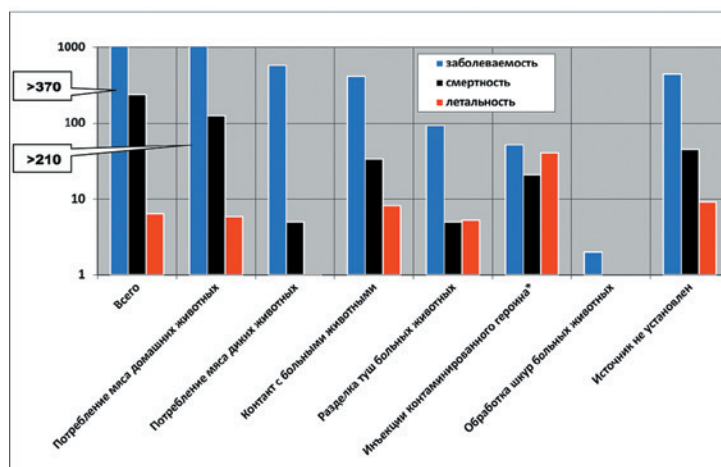


Рис. 1. Заболеваемость, смертность, летальность людей при сибирской язве в мире и различные контакты с инфицированными материалами

Данные ProMED, 2007–2017 гг. (логарифмическая трансформация).

* Подробнее см. ссылки [2, 9].

Для оценки реальной связи заболеваемости человека и смертности животных как основных признаков эпидемической и эпизоотической составляющих ветеринарной эпидемиологии сибирской язви проведено сопоставление выборки погодовой статистики проявления инфекции в ряде стран Африки, Азии, Ближнего Востока и Европы с наибольшим эпизоотическим и эпидемическим неблагополучием. Данные по избранным странам за анализируемый период (11 лет) объединены в группы пространственно-хронологических единиц-кластеров неблагополучия (число стран × число лет) и суммированы по ряду статистических показателей-критериев. Результаты представлены в таблице.

По данным таблицы можно констатировать, что индексы эпизоотичности/эпидемичности, смертности животных и заболеваемости человека достаточно высоки и могли бы обеспечить статистическую основу сопоставлений этих показателей. При углубленном и де-

тальном анализе возможно найти объяснение большой разницы в отношениях инцидентности «животные/человек» и лимитах для стран Азиатского региона по сравнению с показателями в Африке и Европе.

Вместе с тем необходимо особо отметить чрезвычайно низкие показатели сопряженности неблагополучия по сибирской язве животных и человека (количества и индексы). Более того, во многих странах выбранных регионов зарегистрированы свыше 700 случаев сибирской язви человека в отсутствие регистрируемой смертности животных, что составляет более половины (51%) суммарной заболеваемости человека.

Исходя из результатов следует вывод, что, согласно декларируемой в базе данных ProMED инцидентности, статистической связи и каких-либо ветеринарно-эпидемиологических ассоциаций между случаями сибирской язви животных и человека не выявляется.

Несмотря на определенную условность хронологического, пространственного и иного совпадения регистрируемой эпизоотичности/эпидемичности сибирской язви в погодовом измерении, эти данные не находят реального объяснения, требуют специального социально-эпидемиологического анализа и на текущем этапе могут быть зафиксированы лишь как факт.

В порядке исключения показатели для европейских стран могут быть обусловлены известным в последние годы явлением возникновения массовых случаев новой клинической формы сибиреязвенной инфекции человека с нетрадиционными путями заражения за счет употребления наркоманами героина, загрязненного спорами *Bacillus anthracis* [2, 9].

Как сказано выше, сибирская язва человека с различным исходом возникает вследствие разнообразных контактов с продуктами и сырьем от инфицированных животных. Результаты количественного и графического анализа роли различных факторов риска заражения человека представлены на рисунках 1 и 2. Анализ осуществлен на основании данных, зарегистрированных в ProMED за 2007–2017 гг.

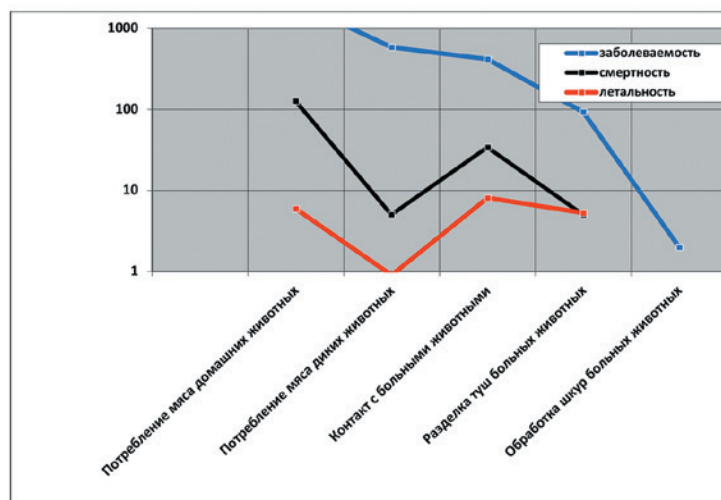
Исходя из данных, представленных на рисунке 1, в числе случаев заражения человека сибирской язвой можно выделить по меньшей мере три различные группы причин: (i) факторы риска тривиального порядка, в частности, потребление мяса инфицированных животных, как домашних, так и диких; разнообразные контакты с больными животными; разделка туш прирезанных больных животных (не исключается и разделка яввших); обработка шкур больных (трупов); (ii) экстраординарные причины неестественного характера, в частности, потребление загрязненного героина среди наркоманов (сюда же относятся реальные факты применения *Bac. anthracis* в качестве агента биотеррора [5]); (iii) неустановленные источники заболевания.

На последнюю группу приходится существенная доля заболеваемости (более 10% с летальностью также около 10%), что принципиально соответствует вышесказанному данным таблицы и, возможно, объясняется низкой санитарной культурой скотоводов и аборигенов населения отдельных регионов третьего мира.

Среди количественно и графически охарактеризованных тривиальных факторов зоогенного риска заболеваемости человека (рис. 2) основное значение имеют по нисходящей): употребление в пищу инфицированных продуктов от домашних животных (абсолютное преобладание, до 70%) → от диких животных → кон-

Рис. 2. Тривиальные контакты людей с инфицированными материалами, заболеваемость, смертность и летальность как их следствие

Данные ProMED, 2007–2017 гг. (логарифмическая трансформация).



такты с больными животными → разделка туш больных животных → обработка шкур больных животных. Порядок расположения факторов риска летальности иной: потребление мяса домашних животных → контакт с больными животными → потребление мяса диких животных и разделка туш.

Графически выраженные показатели фактически свидетельствуют о различной эффективности тривиальных факторов риска и их последствий в эпидемиологии сибирской язвы. Как и в случае оценки ветеринарно-эпидемиологических ассоциаций, это не находит реального объяснения, требует специального анализа и может быть зафиксировано только как факт.

Абсолютное преобладание пищевого пути лишь с известной долей условности можно объяснить большими дозами возбудителя, вовлекаемого в контакт с восприимчивыми субъектами. Наряду с этим, с учетом фатальности кишечной формы инфекции у человека, обращает на себя внимание статистический факт низкой смертности людей при достаточно высокой заболеваемости, в том числе в регионах Африки и Азии (летальность около 10%). Учитывая известное неудовлетворительное состояние общественного здравоохранения в странах третьего мира, в качестве одной из версий можно согласиться с отмеченным выше предположением относительно развития у местных скотоводов естественного приобретенного активного иммунитета за счет регулярного потребления ими инфицированных продуктов животного происхождения [11, 13].

В целом полученные результаты количественного и графического порядка свидетельствуют о многочисленных невыясненных аспектах ветеринарной эпидемиологии сибирской язвы.

Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5–100».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биглхол Р., Бонита Р., Кьеллстрем Т. Основы эпидемиологии. – Женева: ВОЗ, 1994. – 259 с.
- Еременко Е. И., Рязанова А. Г., Буравцева Н. П. Современная ситуация по сибирской язве в России и мире. Основные тенденции и особенности // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 1. – С. 65–71; DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-65-71.
- Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Логвин Ф. В., Кондратенко Т. А., Водяницкая С. Ю. Сибирская язва в мире, странах СНГ и Российской Федерации (обзор литературы) // Медицинский вестник Юга России. – 2017. – Т. 8, № 3. – С. 17–22; DOI: 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.
- Макаров В. В., Брико Н. И. Мировой зооанализ сибирской язвы // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2011. – № 2. – С. 13–18.
- Общая эпидемиология с основами доказательной медицины: руководство к практическим занятиям / под ред. В. И. Покровского, Н. И. Брико. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 496 с.
- Оценка эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по сибирской язве в 2016 г., прогноз на 2017 г. / А. Г. Рязанова, Е. И. Еременко, Л. Ю. Аксенова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 1. – С. 21–23; DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-21-23.
- Сибирская язва: эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация в мире, странах постсоветского пространства и Российской Федерации в 2011–2016 годы / З. Ф. Дугаржапова, Э. Г. Гольдапель, М. В. Чеснокова [и др.] // Медицинский альманах. – 2017. – № 4 (49). – С. 97–101; DOI: 10.21145/2499-9954-2017-4-97-101.
- Супотницкий М. В. Героиновая сибирская язва в Шотландии и Германии // Биопрепараты. Профилактика, диагностика и лечение. – 2011. – № 1 (41). – С. 40–44.

10. Эпизоотологический метод исследования: учебное пособие / В. В. Макаров, А. В. Святковский, В. А. Кузьмин, О. И. Сухарев. – СПб.: Лань, 2009. – 224 с.

11. Anthrax in humans and animals / WHO. – 4th ed. – Geneva, 2008. – 208 p. – URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/97503/9789241547536_eng.pdf (дата обращения: 01.12.18).

12. Anthrax outbreaks: A warning for improved prevention, control and heightened awareness / S. Shadomy, A. El Idrissi, E. Raizman [et al.] // *Empres Watch*. – 2016. – Vol. 37. – URL: <http://www.fao.org/3/a-i6124e.pdf> (дата обращения: 01.12.18).

13. Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Human and Animals / WHO/EMC/ZDI/98.6. – 3rd ed. – Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998. – URL: http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/WHO EMC_ZDI_98_6/en/ (дата обращения: 01.12.18).

14. ProMed. International Society for Infectious Diseases. – URL: <http://www.promedmail.org/>.

REFERENCES

- Beaglehole R., Bonita R., Kjellström T. Basic epidemiology. Geneva: WHO, 1994.
- Yeremenko Ye. I., Ryzanova A. G., Buravtseva N. P. Current anthrax situation in Russia and in the world. Basic trends and features [Sovremennaya situatsiya po sibirskoy yazve v Rossii i mire. Osnovnye tendentsii i osobennosti]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 1: 65–71; DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-65-71 (in Russian).
- Lakin G. F. Biometrics: Study guide for specialized biological higher educational establishments [Biometriya: uchebnoe posobie dlya biol. spec. vuzov]. 4th ed., revised and enlarged. M.: Vysshaya Shkola, 1990 (in Russian).
- Logvin F. V., Kondratenko T. A., Vodyanitskaya S. Yu. Anthrax in the world, CIS and Russian Federation (review) [Sibirskaya yazva v mire, stranah SNG i Rossijskoj Federacii (obzor literatury)]. *Meditsinskii Vestnik Yuga Rossii*. 2017; 8 (3): 17–22; DOI: 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22 (in Russian).
- Makarov V. V., Briko N. I. The worldwide nosoarea of anthrax [Mirovoj nozoareal sibirskoy yazvy]. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2011; 2: 13–18 (in Russian).
- General epidemiology including basics of evidence based medicine: practical guideline [Obshchaya ehpidemiologiya s osnovami dokazatel'noj mediciny: rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam]. ed. V. I. Pokrovsky, N. I. Briko. 2nd ed., revised and enlarged. M.: GEOTAR-Media, 2012 (in Russian).
- Evaluation of anthrax epidemiological and epizootological situation in 2016; prognosis for 2017 [Ocenka ehpidemiologicheskoy i ehpi-zootologicheskoy obstanovki po sibirskoy yazve v 2016 g., prognoz na 2017 g.]. A. G. Ryzanova, Ye. I. Yeremenko, L. Yu. Aksyonova [et al.]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 1: 21–23; DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-21-23 (in Russian).
- Anthrax: epizootological and epidemiological situation in the world, post-Soviet countries and Russian Federation in 2011–2016 [Sibirskaya yazva: ehpi-zootologo-ehpidemiologicheskaya situatsiya v mire, stranah postsovetского prostranstva i Rossijskoj Federacii v 2011–2016 gody]. Z. F. Dugarzhapova, E. G. Goldapel, M. V. Chesnokova [et al.]. *Meditsinskij al'manah*. 2017; 4 (49): 97–101; DOI: 10.21145/2499-9954-2017-4-97-101 (in Russian).
- Supotnitsky M. V. Heroin anthrax in Scotland and Germany [Geroinovaya sibirskaya yazva v Shotlandii i Germanii]. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2011; 1 (41): 40–44 (in Russian).
- Epizootological test method: Study guide [Epizootologicheskij metod issledovaniya: uchebnoe posobie]. V. V. Makarov, A. V. Svyatkovskiy, V. A. Kuzmin, O. I. Sukharev. SPb.: Lan', 2009 (in Russian).
- Anthrax in humans and animals. WHO. 4th ed. Geneva, 2008. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/97503/9789241547536_eng.pdf (access date: 01.12.18).
- Anthrax outbreaks: A warning for improved prevention, control and heightened awareness. S. Shadomy, A. El Idrissi, E. Raizman [et al.]. *Empres Watch*. 2016; 37. URL: <http://www.fao.org/3/a-i6124e.pdf> (access date: 01.12.18).
- Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Human and Animals. WHO/EMC/ZDI/98.6. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998. URL: http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/WHO EMC_ZDI_98_6/en/ (access date: 01.12.18).
- ProMed. International Society for Infectious Diseases. URL: <http://www.promedmail.org/>.

Поступила 26.12.18

Принята в печать 18.01.19



ДИЕВ ВЯЧЕСЛАВ ИВАНОВИЧ (10.12.1938–14.12.2018)

14 декабря 2018 г. в возрасте 80 лет скоропостижно скончался Диев Вячеслав Иванович – известный ученый в области ветеринарной вирусологии и эпизоотологии, доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный ветеринарный врач РФ, эксперт ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору.

Вячеслав Иванович родился 10 декабря 1938 г. в с. Чиракчи Кашкадарьинской области Узбекской ССР. В 1962 г. окончил ветеринарный факультет Самаркандского сельскохозяйственного института. С 1962 по 1965 г. работал директором областной ветеринарной лаборатории – главным эпизоотологом Горно-Бадахшанской автономной области Таджикской ССР. С 1965 по 1966 г. был младшим научным сотрудником Таджикского научно-исследовательского ветеринарного института (НИВИ), с 1966 по 1967 г. – начальником эпизоотического отряда противоящурной экспедиции МСХ Таджикской ССР. С 1967 по 1970 г. обучался в аспирантуре Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института (ВНИИЯ МСХ СССР, г. Владимир). С 1970 по 1973 г. – младший научный сотрудник Таджикского НИВИ. В 1972 г. защитил кандидатскую диссертацию.

С 1973 по 1980 г. работал старшим научным сотрудником, в 1980–1988 гг. – заведующим лабораторией, в 1988–1991 гг. – заместителем директора, в 1991–1992 гг. – директором Среднеазиатского филиала ВНИИЯ (г. Душанбе).

В 1992 г. был избран по конкурсу заведующим лабораторией культивирования вирусов Всероссийского

научно-исследовательского института защиты животных (ВНИИЗЖ МСХ РФ, г. Владимир). С 1995 по 2000 г. работал заведующим лабораторией болезней мелкого рогатого скота, в 2000 г. назначен заведующим отделом биологического и технологического контроля ветеринарных препаратов – главным ведомственным контролером ВНИИЗЖ.

Вячеслав Иванович в 1999 г. успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук, в 2009 г. ему было присвоено звание профессора.

Научное направление его исследований – изучение иммунобиологических свойств вирусов таких болезней, как ящур разных типов, оспа овец и коз, чума мелких жвачных, эфемерная лихорадка крупного рогатого скота, катаральная лихорадка овец, африканская чума лошадей, участие в разработке средств специфической профилактики и диагностики особо опасных болезней животных; оценка эффективности вновь разработанных препаратов. Им были определены возможности одновременной вакцинации овец против ящура разных типов, а также других инфекций: клостридиозов, бруцеллеза, сибирской язвы и лептоспироза. Обстоятельные исследования посвящены разработке и изучению эффективности сухих культуральных вирусвакцин против болезни Ауески из маркированного штамма «ВК», против оспы овец из штамма «ВНИИЗЖ». Вячеслав Иванович много занимался разработкой и изготовлением наборов для серологической диагностики оспы овец, эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, наборов для диагностики оспы овец методом ИФА.

Отдел биологического и технологического контроля ВНИИЗЖ, возглавляемый В. И. Диевым, осуществлял контроль качества выпускаемых вакцин, диагностикумов, химиотерапевтических и других препаратов. Имея большой практический опыт работы ветеринарным врачом, Вячеслав Иванович систематически выезжал в командировки по заданиям МСХ СССР и РФ в различные регионы России и страны СНГ для оказания практической помощи на местах при ликвидации эпизоотических очагов особо опасных болезней.

В. И. Диевым подготовлено 6 кандидатов ветеринарных наук, опубликовано свыше 150 научных работ, в том числе в соавторстве монография «Морбилливирусные болезни млекопитающих» (Владимир, 2018), получено 12 патентов РФ на изобретения. На протяжении нескольких лет Вячеслав Иванович являлся членом диссертационных советов при ФГБУ «ВНИИЗЖ» и ГНУ ВНИИВВиМ.

В 2001 г. В. И. Диеву присвоено почетное звание «Заслуженный ветеринарный врач РФ». Кроме того, он награжден медалями «За трудовые заслуги», «Ветеран труда», медалями ВДНХ, почетными грамотами МСХ СССР и РФ, Россельхознадзора.

Широкая научная эрудиция, большой практический опыт, профессиональная творческая инициатива, принципиальность и высокая работоспособность Вячеслава Ивановича Диева сочетались с чуткостью и отзывчивостью. Все это снискало ему заслуженный авторитет, уважение и широкую известность как в нашей стране, так и за рубежом. Таким он останется в памяти своих коллег и друзей.

*Администрация,
профсоюзный комитет,
сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ»*

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

**ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ
ВИРУСВАКЦИНУ ПРОТИВ ОСПЫ ОВЕЦ
И НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРС**

Вирусвакцина против оспы овец и нодулярного дерматита крупного рогатого скота культуральная сухая является единственным зарегистрированным на территории Российской Федерации вакцинным препаратом, официально рекомендуемым для профилактики нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Наблюдается широкий спрос на данный препарат, который нашел свое применение в животноводческих хозяйствах не только Российской Федерации, но и зарубежных стран, неблагополучных или угрожаемых по нодулярному дерматиту КРС. На сегодняшний день проведен комплекс доклинических исследований и клинических испытаний вирусвакцины



против оспы овец культуральной сухой на предмет ее безвредности для КРС и эффективности для специфической профилактики нодулярного дерматита. Результаты проведенных исследований показали отсутствие реверсивности вакцинного штамма и абсолютную безвредность испытуемого препарата для КРС, а также высокую защиту вакцинированного поголовья от заражения вирусом нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Следует отметить, что все испытания проводились согласно рекомендациям МЭБ.

Во всех животноводческих хозяйствах вакцина зарекомендовала себя как надежный и безвредный препарат, защищающий вакцинированное поголовье от клинического проявления нодулярного дерматита крупного рогатого скота и оспы овец, не вызывающий каких-либо поствакцинальных осложнений.

**По вопросам приобретения ветеринарных препаратов производства
ФГБУ «ВНИИЗЖ» необходимо обращаться по телефонам:
8 (4922) 52-99-24, (4922) 26-15-25**