



ISSN 2304-196X (Print)
ISSN 2658-6959 (Online)

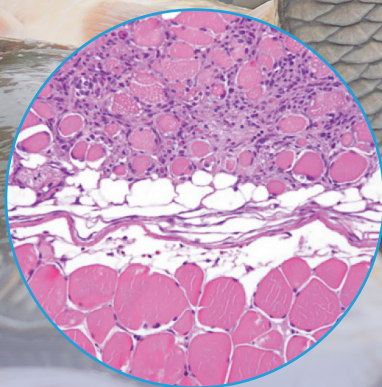
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY SCIENCE TODAY

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL



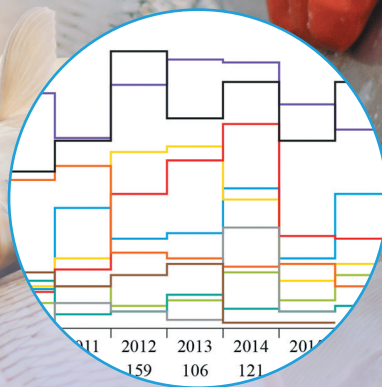
Воспаление сердечных
и скелетных мышц –
новое опасное заболевание
культивируемых лососевых рыб
с. 3

**Heart and skeletal muscle
inflammation – novel dangerous
disease of farmed *Salmonidae*
p. 3**



Применение полимеразной
цепной реакции для выявления
возбудителей некоторых особо
опасных вирусных болезней рыб
с. 11

**Polymerase chain reaction
for detection of some highly
dangerous viral
fish disease agents
p. 11**



Микотоксикологический
мониторинг. Сообщение 1.
Полнорацонные комбикорма
для свиней и птицы
(2009–2018 гг.)
с. 60

**Mycotoxinological monitoring.
Part 1. Complete mixed feed
for pigs and poultry
(2009–2018)
p. 60**

Журнал «Ветеринария сегодня» включен в Перечень
рецензируемых научных изданий (ВАК):
03.02.02 – Вирусология (ветеринарные науки),
06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология (ветеринарные науки).

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ, МАРТ №1 {32} 2020
VETERINARY SCIENCE TODAY, MARCH №1 {32} 2020

Главный редактор: Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: lozovoy@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5983-7062
тел./факс: 8(4922)26-38-77

Шеф-редактор: Юлия Мелано, Россельхознадзор, г. Москва, Россия, e-mail: j.melano@ya.ru

Выпускающие редакторы:

Татьяна Никешина, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: nikeshina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0959-5915; Тел: 8(4922)26-15-12, доб. 22-27
Анастасия Мазнева, ООО «Да Винчи Медиа», г. Москва, Россия, e-mail: a.v.mazneva@gmail.com

Editor-in-Chief: Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Head for Research and Development, FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: lozovoy@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5983-7062
Tel/fax: 8(4922)26-38-77

Editorial Director: Julia Melano, Rosselkhoznadzor, Moscow, Russia, e-mail: j.melano@ya.ru

Executive Editors:

Tatiana Nikesheina, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia, e-mail: nikeshina@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-0959-5915; Tel: 8 (4922) 26-15-12, ext. 22-27
Anastasia Mazneva, LLC «Da Vinci Media», Moscow, Russia, e-mail: a.v.mazneva@gmail.com

Редакционный совет журнала «Ветеринария сегодня»:

Болдбаатар Базартсэрэн – доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

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

Глотов А. Г. – доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБНУ «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» РАН, г. Новосибирск, Россия; ORCID ID 0000-0002-2006-0196

Гринь С. А. – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Россия

Забережный А. Д. – доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0001-7635-2596

Кузьмина Е. В. – доктор ветеринарных наук, Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Россия; ORCID ID 0000-0003-4744-0823

Ломачко Ю. В. – кандидат ветеринарных наук, доцент, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского», г. Минск, Беларусь; ORCID ID 0000-0002-9611-8286

Мищенко Н. В. – доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет им. А. Г. и Н. Г. Столетовых», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-3643-3129

Настасиевич Иван – доктор ветеринарных наук, Институт гигиены и технологии мяса, г. Белград, Сербия; ORCID ID 0000-0002-7141-269X

Недосеков В. В. – доктор ветеринарных наук, профессор, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина; ORCID ID 0000-0001-7581-7478

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

Савченкова И. П. – доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0003-3560-5045

Самарджия Марко – доктор ветеринарных наук, профессор, факультет ветеринарной медицины, Загребский университет, г. Загреб, Хорватия; ORCID ID 0000-0003-0402-3173

Сидорчук А. А. – доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия

Соколович Марьяна – доктор ветеринарных наук, Хорватский ветеринарный институт, Центр птицеводства, г. Загреб, Хорватия; ORCID ID 0000-0003-3373-7415

Сулейманов С. М. – доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I», г. Воронеж, Россия; ORCID ID 0000-0002-0461-9885

Федотов С. В. – доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина» г. Москва, Россия

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

Editorial Council:

Boldbaatar Bazartseren – PhD/DVM, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

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

Alexander G. Glotov – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of the RAS, Novosibirsk, Russia; ORCID ID 0000-0002-2006-0196

Svetlana A. Grin – Doctor of Science (Biology), Professor, Corresponding Member of the RAS, FSBI "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry", Schelkovo, Russia

Alexey D. Zaberezhny – Doctor of Science (Biology), Professor, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0001-7635-2596

Elena V. Kuzminova – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Krasnodar Research Veterinary Institute – Detached Unit FSBS "Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine", Krasnodar, Russia; ORCID ID 0000-0003-4744-0823

Yuri V. Lomako – Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Research Republican Unitary Enterprise the Institute of Experimental Veterinary Medicine n. a. S. N. Vyshesllesky, Minsk, Belarus; ORCID ID 0000-0002-9611-8286

Natalia V. Mischenko – Doctor of Science (Biology), Associate Professor, Vladimir State University, Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-3643-3129

Ivan Nastasijevic – PhD/DVM, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia; ORCID ID 0000-0002-7141-269X

Vitaly V. Nedosekov – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine; ORCID ID 0000-0001-7581-7478

Ivan N. Nikitin – Doctor of Science (Veterinary Medicine), FSBEI HE "Kazan state academy of veterinary medicine n. a. N. E. Bauman", Kazan, Russia

Irina P. Savchenkova – Doctor of Science (Biology), Professor, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0003-3560-5045

Marko Samardžija – PhD/DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia; ORCID ID 0000-0003-0402-3173

Alexander A. Sidorchuk – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia

Marijana Sokolovic – PhD/DVM, Croatian Veterinary Institute, Poultry Centre, Zagreb, Croatia; ORCID ID 0000-0003-3373-7415

Suleiman M. Suleymanov – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Voronezh State Agrarian University n. a. Emperor Peter the Great, Voronezh, Russia; ORCID ID 0000-0002-0461-9885

Sergei V. Fedotov – Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia

Erdenebaatar Janchivdorj – PhD/DVM, Professor, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Дизайн и верстка: Мария Бондарь
Корректор: Ирина Зверева

Design and composition: Maria Bondar
Proof-reader: Irina Zvereva

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) и каталог журналов открытого доступа DOAJ. Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки eLIBRARY.RU, в каталоге DOAJ и по адресу <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Зарегистрированный товарный знак, свидетельство № 514190.

Scientific Journal "Veterinary Science Today" is included in the information analysis system – Russian Science Citation Index (RSCI) and Directory of Open Access Journals (DOAJ). Full-text e-versions of the Journal are published on the website of the Scientific Electronic Library, eLIBRARY.RU, DOAJ, and <http://veterinary.arriah.ru/jour/index>. Registered trademark, certificate No 514190.

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

Редакционная коллегия журнала «Ветеринария сегодня»:

Василевич Ф. И. — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0003-0786-5317

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

Груздев К. Н. — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0003-3159-1969

Гулюкин М. И. — доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0002-7489-6175

Иголкин А. С. — кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-5438-8026

Ирза В. Н. — доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0001-7489-1772

Красочко П. А. — доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь; ORCID ID 0000-0002-4641-4757

Макаров В. В. — доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0002-8464-6380

Метлин А. Е. — доктор ветеринарных наук, заместитель директора по науке ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0002-4283-0171

Мищенко В. А. — доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0003-3751-2168

Плющиков В. Г. — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, директор Аграрно-технологического института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия

Прохватилова Л. Б. — кандидат биологических наук, доцент, начальник отдела координации НИР, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-9560-0724

Прунтова О. В. — доктор биологических наук, профессор, главный эксперт, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

Русалев В. С. — доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Сисягин П. Н. — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», г. Нижний Новгород, Россия; ORCID ID 0000-0003-1085-220X

Старов С. К. — кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по качеству (заместитель главного редактора), ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия

Субботин А. М. — доктор биологических наук, профессор, помощник Президента Республики Беларусь — инспектор по Могилевской области, г. Минск, Беларусь

Чвала И. А. — кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

Шахов А. Г. — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», г. Воронеж, Россия

Шкуратова И. А. — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор, ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения РАН», г. Екатеринбург, Россия; ORCID ID 0000-0003-0025-3545

Editorial Board:

Fyodor I. Vasilyevich — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, FSBEI HE "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA n. a. K. I. Skryabin", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0003-0786-5317

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

Konstantin N. Gruzdev — Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0003-3159-1969

Mikhail I. Gulyukin — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honorary Scientist of the Russian Federation, FSBSI "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0002-7489-6175

Alexey S. Igolkin — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Reference Laboratory, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-5438-8026

Victor N. Irza — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Expert, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0001-7489-1772

Petr A. Krasochko — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Doctor of Science (Biology), Professor, EE "The Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine", Vitebsk, Belarus; ORCID ID 0000-0002-4641-4757

Vladimir V. Makarov — Doctor of Science (Biology), Professor, RUDN University, Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0002-8464-6380

Artyom Ye. Metlin — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research, FGBI "The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality", Moscow, Russia; ORCID ID 0000-0002-4283-0171

Vladimir A. Mischenko — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Chief Researcher, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0003-3751-2168

Vadim G. Plyuschnikov — Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Director of Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Larisa B. Prokhvatilova — Candidate of Science (Biology), Associate Professor, Head of the Department for Research Coordination, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-9560-0724

Olga V. Pruntova — Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0003-3143-7339

Vladimir S. Russaleyev — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Scientific Secretary, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia

Pavel N. Sisyagin — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute — Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia; ORCID ID 0000-0003-1085-220X

Sergey K. Starov — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Deputy Director for Quality (Deputy Editor-in-Chief), FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia

Alexander M. Subbotin — Doctor of Science (Biology), Professor, Aide to the Belarus President — Inspector for Mogilev Oblast, Minsk, Belarus

Ilya A. Chvala — Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Head for Research and Monitoring, FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia; ORCID ID 0000-0002-1659-3256

Alexey G. Shakhov — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, SSI "All-Russian veterinary research institute of pathology, pharmacology and therapy", Voronezh, Russia

Irina A. Shkuratova — Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Associate Member of the Russian Academy of Sciences, Director, FSBSI "Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of RAS", Yekaterinburg, Russia; ORCID ID 0000-0003-0025-3545

Тираж 1150 экземпляров. Цена свободная
Подписной индекс агентства «Роспечать»: 80662
Подписной индекс агентства «Книга-Сервис»: 83862
Учредитель: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЖ»
Издатель: ООО «Вейнард», 129626, г. Москва, Проспект Мира, д. 102, стр. 31, комн. 12

Circulation: 1150. Price: unregulated
Subscription index ("Rospechat" agency): 80662
Subscription index ("Kniga-Service" agency): 83862
Establisher: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"
Publisher: ООО "Veinard", 129626, Moscow, 102 Prospect Mira, bld. 31, office 12

Адрес редакции: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, ФГБУ «ВНИИЖ»
Типография:
ООО «Полиграфический комплекс», 123298, г. Москва, ул. 3-я Хорошевская, д. 18, корп. 1
Подписано в печать 24 марта 2020 года
Дата выхода в свет: 30.03.2020

Editorial Board Office: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"
Printing Office:
ООО "Poligrafichesky Complex", 123298, Moscow, 3-ya Khoroshevskaya ul. 18, build. 1
Approved for print 24 march 2020
Issued: 30.03.2020

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ | БОЛЕЗНИ РЫБ

- 3** Воспаление сердечных и скелетных мышц – новое опасное заболевание культивируемых лососевых рыб
В. П. Мельников, В. В. Пронин

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ РЫБ

- 11** Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей некоторых особо опасных вирусных болезней рыб
А. С. Тарасова, А. В. Перчун, В. П. Мельников

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ЯЩУР

- 17** Влияние мирамистина на пролиферацию клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 и репродукцию вируса ящура в них
М. И. Доронин, Д. А. Лозовой, В. В. Пронин, Д. В. Михалишин, В. А. Стариков, А. В. Борисов, А. А. Шишкова

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БЕШЕНСТВО ЖИВОТНЫХ

- 25** Изучение гуморального иммунитета собак при использовании антирабических инактивированных вакцин, изготовленных с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и GEL 01
А. Н. Балашов, М. И. Доронин, А. В. Борисов, Д. А. Лозовой, Д. В. Михалишин, В. А. Стариков

- 31** Исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферабивак» для диких плотоядных животных
А. В. Шишков, Д. А. Лозовой, А. В. Борисов, Д. В. Михалишин

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

- 38** Опыт борьбы с африканской чумой свиней в Российской Федерации и его значение для других стран
К. Н. Груздев, А. К. Караулов, А. С. Иголкин

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

- 44** Гетерогенность вирусной популяции при инфекционном бронхите кур
Е. В. Овчинникова, Л. О. Щербаклова, С. Н. Колосов, А. Н. Андриясова, Н. Г. Зиняков, З. Б. Никонова, А. А. Козлов, П. Б. Акшалова, Д. А. Алтуни, Д. Б. Андрейчук

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

- 51** Характеристика микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения в Российской Федерации за период с 2015 по 2018 год
И. В. Бородкина, Н. Б. Шадрова, О. В. Прунтова, О. И. Ручнова, Е. С. Ерофеева, С. И. Данильченко, С. Г. Ерофеев

- 60** Микотоксикологический мониторинг. Сообщение 1. Полнорационные комбикорма для свиней и птицы (2009–2018 гг.)
Г. П. Кононенко, А. А. Буркин, Е. В. Зотова

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

- 66** Оценка квалификации ветеринарных лабораторий по результатам межлабораторных слепых испытаний, организованных ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018–2019 гг.
А. Ю. Сухарьков, З. Б. Никонова, О. П. Бьядовская, А. С. Першин, М. И. Шульпин, И. А. Чвала

РЕЦЕНЗИИ

- 71** Рецензия на монографию К. Н. Груздева, А. Е. Метлина «Бешенство животных». Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. 394 с.: ил. ISBN 978-5-900026-73-2

НОВОСТИ

- 72** ПРЕСС-РЕЛИЗ ФАО:
Олег Кобыakov назначен директором Отделения ФАО для связи с Российской Федерацией

CONTENTS

REVIEWS | FISH DISEASES

- 3** Heart and skeletal muscle inflammation – novel dangerous disease of farmed *Salmonidae*
V. P. Melnikov, V. V. Pronin

ORIGINAL ARTICLES | FISH DISEASES

- 11** Polymerase chain reaction for detection of some highly dangerous viral fish disease agents
A. S. Tarasova, A. V. Perchun, V. P. Melnikov

ORIGINAL ARTICLES | FOOT-AND-MOUTH DISEASE

- 17** Miramistin effect on BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferation and FMD virus reproduction in these cells
M. I. Doronin, D. A. Lozovoy, V. V. Pronin, D. V. Mikhailishin, V. A. Starikov, A. V. Borisov, A. A. Shishkova

ORIGINAL ARTICLES | ANIMAL RABIES

- 25** Studies on humoral immunity in dogs after use of rabies inactivated vaccines formulated with Montanide ISA 70 VG and GEL 01 adjuvants
A. N. Balashov, M. I. Doronin, A. V. Borisov, D. A. Lozovoy, D. V. Mikhailishin, V. A. Starikov

- 31** Testing of Ferarabivac anti-rabies live vaccine for wild carnivores for its immunogenicity and protectivity
A. V. Shishkov, D. A. Lozovoy, A. V. Borisov, D. V. Mikhailishin

ORIGINAL ARTICLES | PORCINE DISEASES

- 38** Experience in African swine fever control in the Russian Federation and its value for the other countries
K. N. Gruzdev, A. K. Karaulov, A. S. Igolkin

ORIGINAL ARTICLES | AVIAN DISEASES

- 44** Heterogeneity of avian infectious bronchitis virus population
Ye. V. Ovchinnikova, L. O. Scherbakova, S. N. Kolosov, A. N. Andriyasova, N. G. Zinyakov, Z. B. Nikonova, A. A. Kozlov, P. B. Akshalova, D. A. Altunin, D. B. Andreychuk

ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

- 51** Characteristics of microbial contamination of animal raw materials and products in the Russian Federation from 2015 to 2018
I. V. Borodkina, N. B. Shadrova, O. V. Pruntova, O. I. Ruchnova, Ye. S. Yerofeeva, S. I. Danilchenko, S. G. Yerofeev

- 60** Mycotoxicological monitoring. Part 1. Complete mixed feed for pigs and poultry (2009–2018)
G. P. Kononenko, A. A. Burkin, Ye. V. Zotova

ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

- 66** Evaluation of veterinary laboratory proficiency based on results of interlaboratory comparisons organized by FGBI “ARRIAH” in 2018–2019
A. Yu. Sukharkov, Z. B. Nikonova, O. P. Byadovskaya, A. S. Pershin, M. I. Shulpin, I. A. Chvala

PEER REVIEWS

- 71** Peer-review of monograph of K. N. Gruzdev, A. Ye. Metlin “Animal Rabies”. Vladimir: FGBI “ARRIAH”, 2019. 394 p.: il. ISBN 978-5-900026-73-2

NEWS

- 72** FAO PRESS RELEASE:
Oleg Kobiakov appointed Director of FAO Liaison Office with the Russian Federation

Воспаление сердечных и скелетных мышц — новое опасное заболевание культивируемых лососевых рыб

В. П. Мельников¹, В. В. Пронин²

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0003-2766-2875, e-mail: melnikov@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-6240-3062, e-mail: pronin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Воспаление сердечных и скелетных мышц в настоящее время является одним из самых распространенных, экономически значимых заболеваний культивируемого атлантического лосося и представляет серьезную угрозу его аквакультуре. Впервые болезнь выявлена в 1999 г. в Норвегии. В 2006 г. норвежские ученые доказали ее вирусную этиологию. Воспаление сердечных и скелетных мышц является трансграничной, высококонтагиозной, новой, еще недостаточно изученной вирусной болезнью лососевых рыб, характеризующейся поражением эритроцитов, симптомокомплексом воспаления сердечных и скелетных мышц, нарушением кровообращения и желтухой. Экономический ущерб, наносимый этим заболеванием аквакультуре, чрезвычайно велик. Общая кумулятивная смертность может достигать 30%, а уровень заболеваемости составлять 100%. Снижение качества товарной рыбной продукции из-за меланизированных участков в мышцах лососевых еще больше повышает экономические потери от этого заболевания. Наиболее чувствителен к воспалению сердечных и скелетных мышц выращиваемый в аквакультуре атлантический лосось. Восприимчивыми видами также являются радужная форель, чавыча и кумжа, и этот список продолжает пополняться. Возбудителем заболевания является вирус, относящийся к роду *Orthoreovirus* семейства *Reoviridae*. На сегодняшний день орторевовирус рыб имеет тенденцию к глобальному распространению. Заболевание, вызванное этим вирусом, регистрируют в Норвегии, Шотландии, Ирландии, Исландии, Франции, Германии, Италии, Дании, на Фарерских островах, в Чили, Канаде, на Атлантическом побережье США и на Аляске. Наибольшее количество очагов отмечают в Средней и Северной Норвегии, пограничной с Мурманской областью. Близость неблагополучных территорий к России, протекающий мимо норвежских берегов в сторону Мурманской области Гольфстрим, а также миграция диких лососевых через норвежские территориальные воды в Баренцево, Белое и Печорское моря в совокупности с высокой стабильностью вируса создают высокий уровень угрозы заноса орторевовируса рыб с территории сопредельных стран на территорию Российской Федерации.

Ключевые слова: орторевовирусы рыб, воспаление сердечных и скелетных мышц, болезни рыб, эпизоотическая ситуация.

Для цитирования: Мельников В. П., Пронин В. В. Воспаление сердечных и скелетных мышц — новое опасное заболевание культивируемых лососевых рыб. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 3–10. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-3-10.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Мельников Владимир Петрович, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией болезней аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: melnikov@arriah.ru.

UDC 619:616.98:639.371.12

Heart and skeletal muscle inflammation — novel dangerous disease of farmed *Salmonidae*

V. P. Melnikov¹, V. V. Pronin²

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0003-2766-2875, e-mail: melnikov@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-6240-3062, e-mail: pronin@arriah.ru

SUMMARY

Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) is one of the most widespread economically relevant diseases of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), and it poses serious danger to its aquaculture. The disease was first reported in Norway in 1999. In 2006, the Norwegian researchers demonstrated its viral etiology. Heart and skeletal muscle inflammation is a novel and understudied highly contagious transboundary disease of *Salmonidae* characterized by erythrocyte damage, blood circulation failure, jaundice and aggregated signs of heart and skeletal muscle inflammation. The disease associated economic damage to aquaculture is enormous. Total cumulative mortality can reach 30% and morbidity can amount to 100%. Loss of quality of the commercial fish products due to melanised foci in the salmon's muscles further increases the disease-associated economic losses. Aquacultured Atlantic salmon is the most susceptible to HSMI. Rainbow trout, chub salmon and bull trout are also susceptible species and the list is still being continued. The disease is caused by the virus belonging to genus *Orthoreovirus* in the family *Reoviridae*. Currently Piscine orthoreovirus demonstrates the tendency towards its global spread. The virus-induced disease is reported in Norway, Scotland,

Ireland, Iceland, France, Germany, Italy, Denmark and Alaska. The majority of the outbreaks are registered in Central and Northern parts of Norway, which borders the Murmansk Oblast. The vicinity of the affected areas to Russia, the Gulf Stream passing the Norwegian shore while moving towards the Murmansk Oblast as well as wild *Salmonidae* migration to the Barents Sea, White Sea and Pechora Sea through the Norwegian territorial waters coupled with high stability of the virus compose high threat of Piscine orthoreovirus introduction to the Russian Federation from the adjacent countries.

Key words: Piscine orthoreoviruses, heart and skeletal muscle inflammation (HSMI), epidemic situation.

For citation: Melnikov V. P., Pronin V. V. Heart and skeletal muscle inflammation – novel dangerous disease of farmed *Salmonidae*. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 3–10. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-3-10.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Vladimir P. Melnikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, FGBl "ARRIAH", e-mail: melnikov@arriah.ru.

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Воспаление сердечных и скелетных мышц (BCCM, Heart and skeletal muscle inflammation – HSMI) было впервые обнаружено в 1999 г. у атлантического лосося, выращенного на рыболовной ферме в Норвегии [1]. Причина заболевания долгое время оставалась неизвестной. Предположение о вирусной этиологии было высказано лишь в 2004 г., позже инфекционную природу болезни доказали норвежские ученые [1, 2]. В 2006 г. вирус был обнаружен при исследовании методом электронной микроскопии [3]. В 2010 г. с помощью молекулярно-биологических методов патоген был идентифицирован как реовирус [4], а позже отнесен к роду ортореовирусов рыб (*Piscine orthoreovirus*, PRV) [5]. В 2014 г. O. W. Finstad et al. установили, что PRV размножается в эритроцитах [6]. В 2016 г. ученые из Японии доказали, что известный с 1970-х гг. синдром эритроцитарных телец-включений (СЭТВ, Erythrocytic inclusion body syndrome, EIBS) у кижуча в Японии был вызван генетическим вариантом PRV [7], и ортореовирусы разделили на три типа. Последнее доказательство того, что ортореовирус рыб является возбудителем BCCM, было продемонстрировано O. Wessel et al. в 2017 г. [8].

КЛАССИФИКАЦИЯ

Возбудитель воспаления сердечных и скелетных мышц – ортореовирус рыб, *Piscine orthoreovirus*, PRV – относится к роду *Orthoreovirus*. PRV сильно отличается от аквареовирусов. M. J. T. Kibenge et al. провели филогенетический анализ генов сегмента S1 у большого числа доступных изолятов вируса, что позволило им сгруппировать норвежские штаммы PRV в один генотип (PRV-1) с субгенотипами Ia и Ib. Канадские штаммы PRV соответствовали субгенотипу Ia, а чилийские штаммы PRV, выделенные от атлантического лосося, соответствовали субгенотипу Ib [5].

В последние несколько лет были охарактеризованы еще два генетических варианта PRV, которые адаптированы не к атлантическому лосося, а к другим видам лососевых. Один из этих вариантов, обозначенный как PRV-2, является возбудителем СЭТВ на фермах по выращиванию кижуча в Японии [7].

Другой генетический вариант, обозначенный как PRV-3 (также называется вирусом Y, или PRV-*Om*), вызывает BCCM-подобное заболевание у радужной форели [9]. К этому же генотипу относят штаммы PRV, выде-

ленные в Чили у кижуча [10]. Было показано, что PRV-3 более тесно связан с PRV-1, чем PRV-2 [11]. PRV-3 также реплицируется в организме атлантического лосося, но патогенность этого генотипа вируса для данного вида рыб меньше по сравнению с радужной форелью [12].

УСТОЙЧИВОСТЬ ВИРУСА

Ортореовирусы устойчивы к действию дезинфектантов. Вирионы стабильны при значениях pH от 2 до 9, температуре до 55 °C, воздействии жирорастворителей и детергентов. УФ-облучение снижает инфекционность вируса.

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Воспаление сердечных и скелетных мышц – тяжелая болезнь, характеризующаяся высокой заболеваемостью и продолжительностью. Постепенное увеличение тяжести поражения в месяцы, предшествующие появлению клинических признаков, указывает на то, что инфекция может присутствовать на ферме субклинически в течение очень длительного времени [2]. В Норвегии у выращиваемого в аквакультуре атлантического лосося заболеваемость BCCM доходит до 100% с показателем смертности до 20%. В Чили при выращивании в пресной воде смертность обычно не превышает 5%. При выращивании в морской воде наблюдается два пика гибели рыб: первый – через два месяца после перевода из пресной в морскую воду и составляет 2–10%, второй начинается через полгода после первого. Смертность во время второго пика достигает 30% и связана со вторичными инфекциями. Вспышки BCCM у атлантического лосося регистрируют как зимой, так и летом. Это позволяет сделать вывод, что на развитие заболевания сезонность и температура воды влияния не оказывают. Долгое время считалось, что BCCM возникает у рыб только в морской воде, обычно через 5–9 месяцев после перемещения атлантического лосося из пресноводных в морские садки. В последние годы (2016–2019 гг.) заболевание стали регистрировать и на пресноводных фермах [13]. В пресных водоемах PRV поражает молодую рыбу перед смолтификацией [14]. По последним данным, PRV-1 присутствует почти в каждой партии выращиваемого атлантического лосося в морской фазе [8]. Взрослая рыба болеет чаще, чем молодь; самцы болеют чаще, чем самки. Вспышки болезни с повышенным уровнем смертности длятся несколько недель. Количество вируса, обнаруживаемого методом

количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, прямо коррелирует с развитием заболевания [15]. У диких видов рыб вирус выявляют, но клинических признаков заболевания не обнаруживают. Это связано с тем, что в естественной среде больная рыба быстро погибает или поедается хищниками. После переболевания PRV сохраняется в тканях рыб более года [16]. A. B. Kristoffersen et al. показали, что риск развития ВССМ возрастает с увеличением продолжительности жизни рыб, повышением концентрации вируса во внешней среде и увеличением плотности посадки [17].

Географическое распространение и восприимчивые виды. Несмотря на то что PRV широко распространен у культивируемого норвежского лосося [18], а также в диких популяциях атлантического лосося [4], ВССМ отмечено только у культивируемых рыб. Кроме Норвегии PRV широко распространен у аквакультурных атлантического лосося и кижуча в Чили [5, 10], Шотландии, Ирландии, Исландии и на Фарерских островах [19], у выращиваемого и дикого атлантического лосося в Дании [20], культивируемого атлантического лосося и дикой кеты, радужной форели и лосося Кларка в Канаде [5], культивируемых чавычи и кижуча на Атлантическом побережье США [21], выращенных в аквакультуре чавычи и дикого кижуча на Аляске [22]. В экспериментальных условиях K. A. Garver et al. воспроизвели инфекцию PRV у кижуча, чавычи и нерки [16], но патологии сердца или иммунного ответа у этих видов не выявили. Орторевовирус был также обнаружен у 3% исследованной анадромной кумжи, но не был выявлен у арктического гольца [23]. L. Bigarre et al. описали повышенную смертность, вызванную PRV, в популяции кумжи во Франции [24]. Вирус был обнаружен у сбегавшего из садка культивируемого атлантического лосося, что рассматривалось как один из способов распространения заболевания [25]. Во время ПЦР-скрининга проб, полученных от морской рыбы, выловленной вдоль норвежского побережья, C. R. Wiik-Nielsen et al. выявили PRV в низкой концентрации у атлантической мойвы, обыкновенной ставриды и морской корюшки. Авторы предположили, что, вероятно, существуют более сложные взаимосвязи, которые включают несколько носителей и вирусных резервуаров, поскольку не было получено ни одной положительной пробы от рыбы, выловленной вблизи рыбоводческих хозяйств, в которых были зарегистрированы вспышки ВССМ [26].

В Норвегии ВССМ является серьезной проблемой из-за большого количества эпизоотических очагов, в 2014 г. заболевание было диагностировано на 181 ферме [27]. В Чили в первой половине 2015 г. сообщалось о 44 случаях PRV у атлантического лосося [28]. В Британской Колумбии (Канада) 75% исследованных особей культивируемого атлантического лосося были положительными по PRV [29]. Ретроспективные молекулярно-генетические исследования архивных образцов клинического материала, полученного в период с 1974 по 2013 г. из Аляски и Британской Колумбии, показали наличие вируса у различных видов лососевых в образцах 1970-х гг., т. е. до появления аквакультуры атлантического лосося.

Сопровождаемое анемией заболевание, обозначенное как СЭТВ, впервые было описано в 1977 г. у радужной форели [30] и в 1987 г. у чавычи с тихоокеанского

побережья северо-запада США [31]. В 2016 г. в Японии у кижуча с диагнозом СЭТВ был обнаружен орторевовирус, который классифицировали как PRV-2 [7]. Однако, поскольку случаи 1977 и 1987 гг. предшествуют доказательству этиологической роли в заболевании СЭТВ, остается неизвестным, какой этиологический агент (PRV-1 или PRV-2) являлся причиной описанных выше поражений эритроцитов. На сегодняшний день распространение PRV-2 за пределы Японии не доказано.

В 2013 г. в Норвегии было зарегистрировано новое заболевание пресноводной радужной форели, сходное с ВССМ, возбудитель которого был определен как PRV-3 [9]. PRV-3 был обнаружен в Чили у лососевых с признаками поражения сердца [10], у клинически здоровой взрослой радужной форели в Норвегии [32]. В последние годы вирус выявляли во время вспышек заболевания в нескольких европейских странах, включая Шотландию, Германию, Италию и Данию, у радужной форели как с клиническими признаками болезни, так и без них [11]. H. Nauge et al. в 2017 г. опубликовали результаты проведенных опытов по изучению контактной передачи PRV-3 и установили, что вирус данного генотипа активно реплицируется в крови радужной форели и легко передается незараженному хозяину, в то время как его способность к репликации у атлантического лосося ограничена [12]. Есть мнение, что PRV-3 также может быть связан с синдромом пролиферативного потемнения (PDS) у кумжи в примыкающих к Альпам европейских странах [33].

Передача. Горизонтальная передача вируса была подтверждена в лабораторных опытах с зараженными и контактными рыбами [2]. На основании этих экспериментов исследователи сделали вывод, что вирус выделяется и передается через воду. H. Nauge et al. обнаружили вирус в фекалиях экспериментально зараженных рыб [34]. Максимальное количество вируса выделяется через две-три недели после экспериментального заражения, что совпадает с пиковыми уровнями накопления вируса в крови [6]. Вертикальная передача вируса менее изучена, и хотя, вероятно, она не является основным способом, ее необходимо учитывать, пока не появятся доказательства обратного [26]. Путь проникновения вируса в восприимчивый организм до сих пор неизвестен. Возможность передачи PRV морскими видами не может быть исключена. В 2012 г. C. R. Wiik-Nielsen et al. обнаружили геном PRV у золотой корюшки (*Argentina silus*), мойвы (*Mallotus villosus*), обыкновенной ставриды (*Trachurus trachurus*), атлантической сельди (*Clupea harengus*) [26]. Поэтому PRV представляет потенциальную угрозу выживанию популяции дикого атлантического лосося.

ПАТОГЕНЕЗ

Клетками-мишенями PRV являются миоциты, эритроциты и макрофаги. Вирус поражает эритроциты лосося на ранних стадиях инфекции, причем в острой фазе заболевания поражение за короткое время может достигать 50% [6]. В эритроцитах обнаруживают тельца-включения, аналогичные таковым при СЭТВ. Эритроциты рыб, в отличие от эритроцитов млекопитающих, являются ядросодержащими клетками, способными к выработке белка [35], и следовательно, способны поддерживать репликацию вируса. D. Morera и S. A. MacKenzie обнаружили, что эритроциты рыб участвуют в иммунных реакциях организма [36].

Инфицирование эритроцитов PRV приводит к их дисфункции, снижению уровня гемоглобина в крови и анемии. Рыба становится более чувствительна к стрессовым факторам и гипоксическим условиям [37]. Увеличивается нагрузка на сердце, что в сочетании с размножением вируса в клетках сердечной мышцы приводит к поражению и дисфункции этого органа. Из-за сердечной недостаточности возникают нарушения кровообращения (застойные явления). При вскрытии погибших лососей чаще всего обнаруживают признаки нарушения кровообращения. Печень не справляется со своей функцией, что приводит к ее поражению. Размножение PRV в эритроцитах приводит к инфекционной гемолитической анемии и последующей желтухе [10].

По литературным данным, PRV является причиной возникновения синдрома черных (меланизированных) очагов в красной и белой скелетной мускулатуре культивируемого атлантического лосося в Норвегии [38]. У пойкилотермных животных, в том числе и у рыб, есть популяции лейкоцитов, которые продуцируют меланин, являющийся мощным антиоксидантом. Очаговое изменение цвета в мышцах обусловлено меланинпродуцирующими макрофагами (меланомacroфагами), которые в норме встречаются в лимфоидных органах рыб [39]. Функция меланомacroфагов – защита от окислительных повреждений. Патогенез развития меланизированных очагов следующий: цитотоксические иммунные клетки используют окисление для инактивации патогенов. Размножение вируса в миоцитах (хро-

ническая антигенная стимуляция) ведет к хроническим воспалительным реакциям. Меланомacroфаги устремляются в места, где происходят хронические воспалительные реакции. Таким образом, меланизированные очаги в мышечной ткани, вероятно, являются следствием аутоиммунных реакций.

Вирус PRV распространен повсеместно, однако заболевание BCCM развивается не всегда. Из этого можно сделать вывод, что основными пусковыми механизмами заболевания являются стресс и факторы внешней среды.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

Обычно BCCM появляется через 5–9 мес. после перемещения атлантического лосося из пресноводных в морские садки. По внешнему виду больная рыба не отличается от здоровой. В тяжелых случаях можно отметить взъерошенность чешуи, бледность жабр и экзофтальмию. Наблюдаются изменения в поведенческих реакциях. Больные рыбы становятся вялыми, отказываются от корма, наблюдается нарушение координации движения при плавании. Рыбы обычно располагаются около стенки садка и обращены головой к течению, что говорит о нехватке кислорода, повышается смертность [1].

В естественных условиях BCCM осложняется коинфекцией другими вирусными патогенами (альфа-вирусом лососевых – возбудителем заболевания поджелудочной железы (PD), инфекционным некрозом гематопозитической ткани (IHNV), вирусным миокардитом рыб (PMCV) и др.), а также бактериальными и грибковыми заболеваниями (*Piscirickettsia salmonis*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Saprolegnia* sp. и др.), которые делают клиническую картину смазанной [40].

ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

При патологоанатомическом вскрытии у атлантического лосося отмечают признаки анемии (бледность жабр и сердца, желтушность), нарушения гемодинамики и сердечной деятельности (асцит, увеличение сердца и потеря его структуры, кровоизлияния в перикард, воздушный пузырь и висцеральный жир), поражения печени (гепатомегалия, изменение цвета печени, кровоизлияния в печень), увеличение селезенки и почек (рис. 1). Одним из часто встречающихся патологоанатомических признаков является гемоперикард (кровоизлияние в полость перикарда), который провоцирует развитие тампонады сердца и может закончиться кровоизлиянием в полость тела и гибелью рыбы [1, 3, 10, 19]. Поджелудочная железа при BCCM не поражается. Патологические признаки BCCM указывают на недостаточность кровообращения (застойные явления), возникшую из-за сердечной недостаточности.

Патологоанатомические признаки BCCM-подобного заболевания в Чили у культивируемого кижуча включают: бледность жабр, гемоперикард, бледность сердца и желтую печень [10].

Поражение мышц чаще проявляется в более поздние стадии развития заболевания. В мышцах радужной форели распространенные меланизированные очаги незначительны, несмотря на то что она выращивалась в аналогичных с атлантическим лососем условиях (рис. 2). Также нет сообщений о подобных поражениях у диких лососевых [38].

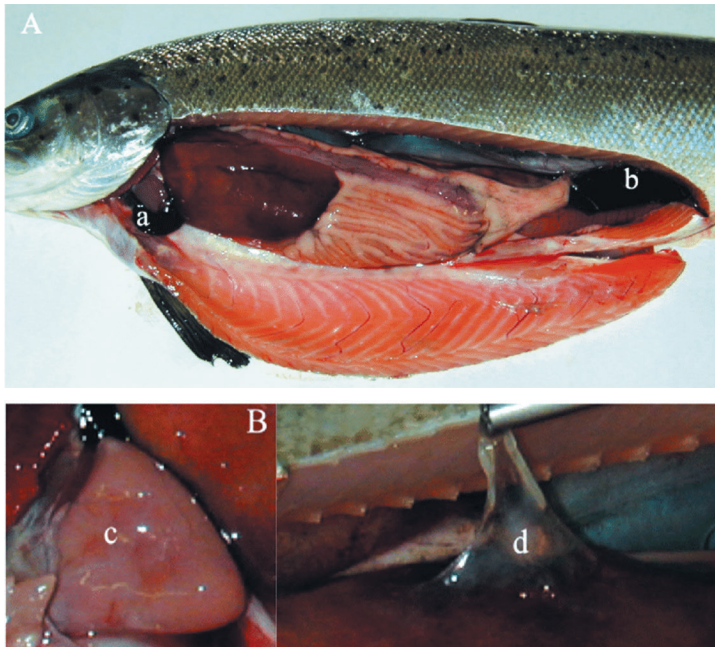


Фото: © R. T. Kongtorp

(<https://www.int-res.com/articles/dao/2004/59/d059p217.pdf>)

Рис. 1. Макроскопические изменения при воспалении сердечных и скелетных мышц (HSMI) у атлантического лосося

A – гемоперикард (a), увеличение селезенки (b);
B – бледное сердце (c), фибриновая пленка на печени (d).

Fig. 1. *Salmo salar*. Macroscopic lesions in heart and skeletal muscle inflammation

A – haemopericardium (a), swollen spleen (b);
B – pale heart (c), fibrinous layer on the liver (d).

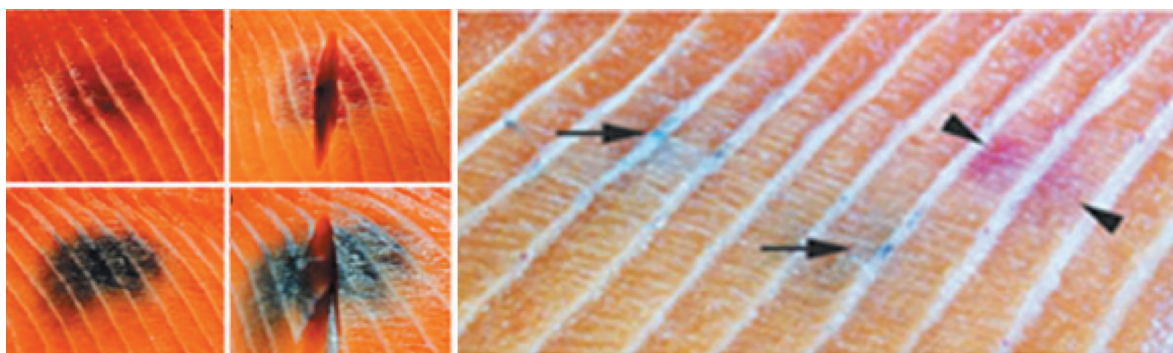


Фото: ©Havard Bjorgen

(https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13567-015-0244-6)

Рис. 2. Изменения в мышцах при симптомокомплексе воспаления сердечных и скелетных мышц (HSMI)

Fig. 2. Muscle lesions in case of aggregated signs of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI)

Еще одним признаком ВССМ является синдром желтухи (jaundice syndrome) у чавычи и кижуча. Причиной синдрома желтухи является инфекционная гемолитическая анемия, связанная с размножением PRV в эритроцитах [10].

ГИСТОПАТОЛОГИЯ

Гистопатологические поражения при ВССМ обнаруживаются в сердце и красной скелетной мышце (миокардит и некроз красной скелетной мышцы, рис. 3). При дегенерации и некрозе мышечных клеток в сердце в обширную воспалительную реакцию вовлекаются как компактный, так и губчатый слои желудочка. Инфильтраты состоят из моноцитов. Встречается обширный эпикардит, обычно тесно связанный с миокардитом. Дегенерация миокарда и некроз наблюдаются на поздних стадиях заболевания. Воспаление красных мышц происходит по той же схеме, что и в сердце: в пораженных миоцитах появляются признаки дегенерации, потери поперечной исчерченности и эозинофилии, вакуолизации и кариорексиса. Также могут наблюдаться очаговый некроз печени, нарушения кровообращения, отек и накопление эритроцитов в некоторых ор-

ганах [1, 2, 3, 6, 27]. Гистопатологические изменения у кижуча при заболевании, связанном с PRV-3, отличались от тех, что отмечались у атлантического лосося и у радужной форели, пораженных орторевиром в Норвегии. У чилийского кижуча воспаление сердца было диффузным и, как правило, затрагивало губчатый слой; поражение красных мышц было незначительным или вовсе отсутствовало [10].

Основными гистологическими признаками синдрома желтухи являются кровоизлияния во все органы и тяжелый гемосидероз, сопровождающийся эритрофагоцитозом в почках и селезенке [10].

ИММУНИТЕТ

Инфицирование PRV активирует как клеточные, так и гуморальные иммунные реакции [41]. Как было отмечено выше, ткани сердца являются местом репликации вируса. Иммунной реакцией на размножение вируса является появление в сердце цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), это говорит о том, что иммунный ответ направлен на зараженные вирусом клетки. О. W. Finstad et al. отметили, что цитотоксические клеточные реакции против инфицированных клеток

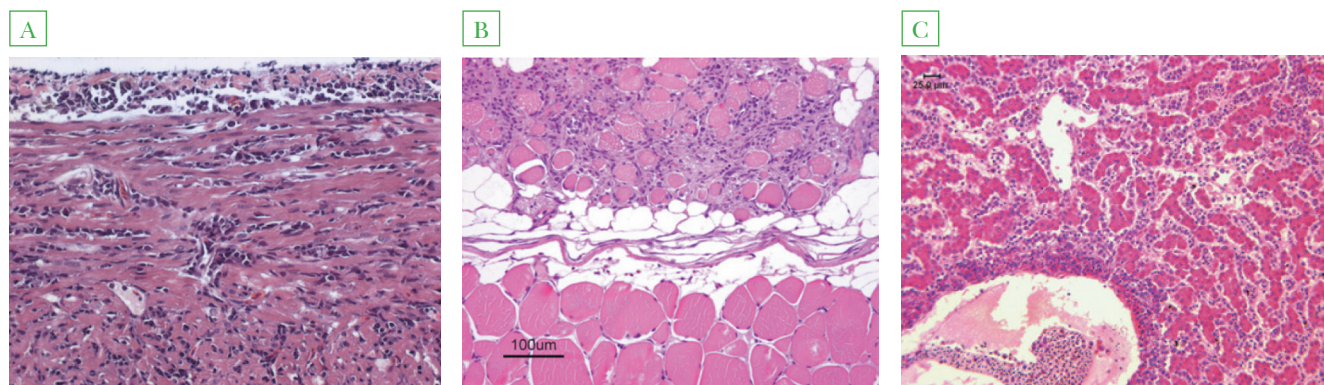


Фото: ©David W. Bruno

(https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-94-007-2010-7.pdf)

Рис. 3. Гистопатологические поражения при ВССМ

A – воспаление в сердце;

B – дегенерация и воспаление красных мышц (вверху);

C – воспаление в печени.

Fig. 3. HSMI histopathological lesions

A – heart inflammation;

B – red muscle degeneration and inflammation (top);

C – liver inflammation.

играют важное значение в иммунитете против ВССМ, в то же время эти реакции напрямую ответственные за развитие поражений в сердце и скелетных мышцах. Эритроциты атлантического лосося являются клетками-мишенями для репликации PRV [6] и могут играть непосредственную роль в иммунном ответе [36]. Эритроциты реагируют на инфекцию интерферон-опосредованным противовирусным иммунным ответом [42], который способен защитить от последующего заражения IHNV, альфавирусом лососевых и, возможно, от других инфекционных агентов [40, 43].

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Диагноз ВССМ основан на гистологических признаках воспаления миокарда, переходящего на эпикард, некроза миокарда, миозита и некроза красной скелетной мышцы [1] в сочетании с постановкой количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). Целевой тканью, отбираемой для диагностики, обычно является сердце, так как необходимо связать наличие вируса с патологией сердечных мышц. ВССМ необходимо дифференцировать от болезни поджелудочной железы [44] и синдрома кардиомиопатии (CMS) [45].

ПРОФИЛАКТИКА И КОНТРОЛЬ

Воспаление сердечных и скелетных мышц не подлежит обязательной нотификации во Всемирную организацию здравоохранения животных (МЭБ). Заболевание, связанное с PRV-инфекцией, было официально зарегистрировано только в Норвегии [4, 46] и Чили [10]. ВССМ было исключено из Национального списка-3 и поэтому в настоящее время определено как не подлежащее уведомлению в Норвегии [27].

Несмотря на выработку специфических антител после заражения PRV [41], вирус повсеместно распространен в популяциях чувствительных к нему рыб. Данный факт указывает на то, что иммунная система не способна полностью элиминировать вирус, и это является проблемой при разработке эффективных вакцин. Несколько производственных компаний и научных учреждений в мире официально поставили цель разработать вакцины против ВССМ с использованием различных стратегий (цельновирионные вакцины, рекомбинантные субъединичные и ДНК-вакцины). В настоящее время ни одной вакцины не создано.

Больная рыба чрезвычайно чувствительна к стрессовым факторам и гипоксическим условиям. Необходимо проводить диагностические исследования по определению наличия вируса PRV в популяции рыб рыбоводного хозяйства. При обнаружении положительных по PRV рыб, для уменьшения потерь от ВССМ, необходимо отказаться от иммуносупрессивных и стрессовых обработок, ограничить транспортировку рыбы и обращаться с ней максимально бережно. Это снизит нагрузку на сердце инфицированных рыб и сократит их гибель.

Для профилактики заболевания целесообразно применение дезинфектантов, уменьшающих количество вирусов и условно-патогенных бактерий во внешней среде. Применение противовоспалительных средств также дает положительный эффект при борьбе с ВССМ. Есть сообщения о разработке лечебных кормов, которые обладают антиоксидантным и противовоспалительным действием, что способ-

ствует сокращению потерь от ВССМ, а также уменьшает долю выбраковки рыб с наличием темных пятен в мышцах [47].

Еще одним способом борьбы с ВССМ является разведение устойчивых к заболеванию рыб и выведение устойчивых пород.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воспаление сердечных и скелетных мышц является инфекционной болезнью рыб с высоким уровнем заболеваемости и длительным течением. В условиях аквакультуры неизбежно происходит интенсификация рыбоводства, включающая увеличение плотности посадки, что облегчает передачу патогена, вызывает стресс и снижает устойчивость к заболеваниям. На сегодняшний день заболевание имеет тенденцию к широкому распространению (страны Европы, Северная и Южная Америка), выявляются новые варианты вируса, увеличивается диапазон чувствительных видов. Заболевание, вызываемое PRV, является третьим по значимости в популяции культивируемого атлантического лосося в Норвегии. Воспаление сердечных и скелетных мышц повсеместно распространено в Норвегии среди культивируемого и дикого атлантического лосося. С 2010 г. в Норвегии ежегодно выявляют от 100 до 200 неблагополучных по ВССМ пунктов [13]. Наибольшее количество очагов отмечают в Средней и Северной Норвегии, пограничной с Мурманской областью. До 20% филе атлантического лосося на перерабатывающих предприятиях Норвегии имеют меланизированные очаги в мышцах [48], что снижает качество продукции и увеличивает экономические потери от этого вируса для аквакультуры. Это говорит о том, что последствия заражения PRV могут быть более тяжелыми, чем предполагалось первоначально.

Несмотря на вышеперечисленные обстоятельства по ВССМ, в 2014 г. Управление по безопасности пищевых продуктов Норвегии исключило это заболевание из Национального списка-3 болезней, подлежащих уведомлению. Поэтому наблюдаемое с 2015 г. снижение количества неблагополучных пунктов, вероятно, не соответствует действительности. Кроме того, в Норвегии отсутствует государственная программа по борьбе с ВССМ, в связи с чем положительных сдвигов в ситуации не предвидится.

Орторевовирус рыб обнаруживают у дикого мигрирующего атлантического лосося [38], что свидетельствует о том, что вирус может распространяться естественным путем на большие расстояния. Доказательством данного факта служит то, что в генетическом отношении варианты PRV, обнаруженные на различных континентах, имеют большое сходство [10].

Приведенные выше данные свидетельствуют о существенной угрозе заноса вируса PRV из сопредельных стран на территорию Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kongtorp R. T., Kjerstad A., Taksdal T., Guttvik A., Falk K. Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a new infectious disease. *J. Fish Dis.* 2004; 27 (6): 351–358. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2004.00549.x.
2. Kongtorp R. T., Taksdal T. Studies with experimental transmission of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 2009; 32 (3): 253–262. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2008.00983.x.
3. Watanabe K., Karlsten M., Devold M., Isdal E., Litlabo A., Ny-lund A. Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle

inflammation (HSMI). *Dis. Aquat. Organ.* 2006; 70 (3): 183–192. DOI: 10.3354/dao070183.

4. Palacios G., Lovoll M., Tengs T., Hornig M., Hutchison S., Hui J., Kongtorp R.-T., Savji N., Bussetti A. V., Solovoyov A., Kristoffersen A. B., Celone C., Street C., Trifonov V., Hirschberg D. L., Rabadan R., Egholm M., Rimstad E., Lipkin W. I. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One*. 2010; 5(7):e11487. DOI: 10.1371/journal.pone.0011487.

5. Kibenge M. J. T., Iwamoto T., Wang Y., Morton A., Godoy M. G., Kibenge F. S. Whole-genome analysis of piscine reovirus (PRV) shows PRV represents a new genus in family Reoviridae and its genome segment S1 sequences group it into two separate sub-genotypes. *Virology*. 2013; 10:230. DOI: 10.1186/1743-422X-10-230.

6. Finstad O. W., Dahle M. K., Lindholm T. H., Nyman I. B., Lovoll M., Wallace C., Olsen C. M., Storset A. K., Rimstad E. Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Vet. Res.* 2014; 45:35. DOI: 10.1186/1297-9716-45-35.

7. Takano T., Nawata A., Sakai T., Matsuyama T., Ito T., Kurita J., Terashima S., Yasuie M., Nakamura Y., Fujiwara A., Kumagai A., Nakayasu C. Full-genome sequencing and confirmation of the causative agent of erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon identifies a new type of *Piscine orthoreovirus*. *PLoS One*. 2016; 11(10):e0165424. DOI: 10.1371/journal.pone.0165424.

8. Wessel O., Braaen S., Alarcon M., Haatveit H., Roos N., Markussen T., Tengs T., Dahle M. K., Rimstad E. Infection with purified *Piscine orthoreovirus* demonstrates a causal relationship with heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0183781. DOI: 10.1371/journal.pone.0183781.

9. Olsen A. B., Hjortaa M., Tengs T., Hellberg H., Johansen R. First description of a new disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) similar to heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) and detection of a gene sequence related to piscine orthoreovirus (PRV). *PLoS One*. 2015; 10(7):e0131638. DOI: 10.1371/journal.pone.0131638.

10. Godoy M. G., Kibenge M. J. T., Wang Y., Suarez R., Leiva C., Vallejos F., Kibenge F. S. B. First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. *Virology*. 2016; 13:98. DOI: 10.1186/s12985-016-0554-y.

11. Dhamotharan K., Vendramin N., Markussen T., Wessel O., Cuenca A., Nyman I. B., Olsen A. B., Tengs T., Krudtaa D. M., Rimstad E. Molecular and antigenic characterization of *Piscine orthoreovirus* (PRV) from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Viruses*. 2018; 10 (4):170. DOI: 10.3390/v10040170.

12. Hauge H., Vendramin N., Taksdal T., Olsen A. B., Wessel O., Mikkelsen S. S., Alencar A. L. F., Olesen N. J., Dahle M. K. Infection experiments with novel *Piscine orthoreovirus* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in salmonids. *PLoS One*. 2017; 12 (7):e0180293. DOI: 10.1371/journal.pone.0180293.

13. Hjeltne B., Borno G., Jansen M. D., Haukaas A., Walde C. (Eds.). The health situation in Norwegian aquaculture 2016 (Rapport 4b, 2017). *Norwegian Veterinary Institute*. 2017. Available at: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/fish-health-report-2016> (date of access: 10.11.2019).

14. Wiik-Nielsen C. R., Ski P.-M. R., Aunsmo A., Lovoll M. Prevalence of viral RNA from piscine reovirus and piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish and progeny. *J. Fish Dis.* 2012; 35 (2): 169–171. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2011.01328.x.

15. Garseth A. H., Biering E., Aunsmo A. Associations between piscine reovirus infection and life history traits in wild-caught Atlantic salmon *Salmo salar* L. in Norway. *Prev. Vet. Med.* 2013; 112 (1–2): 138–146. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.06.007.

16. Garver K. A., Johnson S. C., Polinski M. P., Bradshaw J. C., Marty G. D., Snyman H. N., Morrison D. B., Richard J. Piscine orthoreovirus from Western North America is transmissible to Atlantic Salmon and Sockeye Salmon but fails to cause heart and skeletal muscle inflammation. *PLoS One*. 2016; 11 (1):e0146229. DOI: 10.1371/journal.pone.0146229.

17. Kristoffersen A. B., Bang J. B., Jansen P. A. Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming. *Prev. Vet. Med.* 2013; 109 (1–2): 136–143. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.08.012.

18. Lovoll M., Alarcón M., Jensen B. B., Taksdal T., Kristoffersen A. B., Tengs T. Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. *Dis. Aquat. Organ.* 2012; 99 (1): 7–12. DOI: 10.3354/dao02451.

19. Ferguson H. W., Kongtorp R. T., Taksdal T., Graham D., Falk K. An outbreak of disease resembling heart and skeletal muscle inflammation in Scottish farmed salmon, *Salmo salar* L., with observations on myocardial regeneration. *J. Fish Dis.* 2005; 28 (2): 119–123. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2004.00602.x.

20. Mikkelsen S. S., Arno J., Bruun M. S. PMCV and PRV occurrence in wild and farmed fish in Denmark. *European Union Reference Laboratory for*

Fish Diseases Report: 18th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for Fish Diseases, 3–4 June 2014. Frederiksberg, 2014: 38–39. Available at: https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/103751339/Pages_from_Report_18th_AW_2014_1_.pdf (date of access: 10.11.2019).

21. WFRF (Western Fisheries Research Center) Information Sheet, May 2014. Piscine reovirus. – Available at: <http://wfrf.usgs.gov/field-stations/hq/viruspdf/piscinereovirus05272014.pdf> (date of access: 10.11.2019).

22. Marty G. D., Morrison D. B., Bidulka J., Joseph T., Siah A. Piscine reovirus in wild and farmed salmonids in British Columbia, Canada: 1974–2013. *J. Fish Dis.* 2015; 38 (8): 713–728. DOI: 10.1111/jfd.12285.

23. Garseth A. H., Fritsvold C., Opheim M., Skjerve E., Biering E. Piscine reovirus (PRV) in wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and sea-trout, *Salmo trutta* L., in Norway. *J. Fish Dis.* 2013; 36 (5): 483–493. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01450.x.

24. Bigarre L., Boitard P.-M., Labrut S., Jamin M. Short item. Emergence of HSMI syndrome on salmonids in France. *Bull. Epidemiol. Sante animale – alimentation*. July 2018. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/334561736> (date of access: 10.11.2019).

25. Madhun A. S., Karlsbakk E., Isachsen C. H., Omdal L. M., Eide Sorvik A. G., Skaala O., Barlaup B. T., Glover K. A. Potential disease interaction reinforced: double-virus-infected escaped farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., recaptured in a nearby river. *J. Fish Dis.* 2015; 38 (2): 209–219. DOI: 10.1111/jfd.12228.

26. Wiik-Nielsen C. R., Lovoll M., Sandlund N., Faller R., Wiik-Nielsen J., Bang Jensen B. First detection of piscine reovirus (PRV) in marine fish species. *Dis. Aquat. Organ.* 2012; 97 (3): 255–258. DOI: 10.3354/dao02425.

27. Bornø G., Lie Linaker M. (eds) Fiskehelserapporten–2014. *Harstad: Veterinærinstituttet*. 2015: 38. Available at: https://www.vetinst.no/attachment/download/fish_health_report_2014.pdf (date of access: 11.11.2019).

28. Informe sanitario de la Salmonicultura en Centros Marinos 2014. Departamento de Salud Animal Subdirección Nacional de Acuicultura Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, febrero 2015. Available at: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_2014.pdf (date of access: 11.11.2019).

29. Feinberg J. Science divided on fish virus found in Cultus Lake trout. *The Chilliwack Progress*. July 23, 2012. Available at: <https://www.theprogress.com/news/science-divided-on-fish-virus-found-in-cultus-lake-trout> (date of access: 11.11.2019).

30. Landolt M. L., MacMillan J. R., Patterson M. Detection of an intra-erythrocytic virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Health News*. 1977; 6: 4–6.

31. Leek S. L. Viral erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) occurring in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared in freshwater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1987; 44: 685–688.

32. Gjevne A. G., Modahl I., Spilberg B., Lyngstad T. M. The surveillance programme for virus associated with disease in rainbow trout (PRV-Om) in 2016 (Annual report). The Norwegian Veterinary Institute; 2017: 8. Available at: https://www.vetinst.no/overvaking/Piscine-orthoreovirus-Oncorhynchus-mykiss-PRVom-fisk/_/attachment/download/d6ff8741-307e-4c30-8456-50b85002b678:1c5088843c6f2c7dd4bc6e8c0c1d8fd-caad7c921/2017_OK_PRVom_2016.pdf (date of access: 11.11.2019).

33. Kuehn R., Stoeckle B. C., Young M., Popp L., Tæubert J.-E., Pfaffl M. W., Geist J. Identification of a piscine reovirus-related pathogen in proliferative darkening syndrome (PDS) infected brown trout (*Salmo trutta fario*) using a next-generation technology detection pipeline. *PLoS One*. 2018; 13(10):e0206164. DOI: 10.1371/journal.pone.0206164.

34. Hauge H., Dahle M., Moldal T., Thoen E., Gjevne A.-G., Weli S., Alarcón M., Grove S. Piscine orthoreovirus can infect and shed through the intestine in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet. Res.* 2016; 47 (1): 57–69. DOI: 10.1186/s13567-016-0343-z.

35. Lund S. G., Phillips M. C., Moyes C. D., Tufts B. L. The effects of cell ageing on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J. Exp. Biol.* 2000; 203 (14): 2219–2228. PMID: 10862734.

36. Morera D., MacKenzie S. A. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Vet. Res.* 2011; 42:89. DOI: 10.1186/1297-9716-42-89.

37. Lund M., Krudtaa Dahle M., Timmerhaus G., Alarcon M., Powell M., Aspehaug V., Rimstad E., Jorgensen S. M. Hypoxia tolerance and responses to hypoxic stress during heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One*. 2017; 12 (7):e0181109; DOI: 10.1371/journal.pone.0181109.

38. Bjorgen H., Wessel O., Fjellidal P. G., Hansen T., Sveier H., Sæbo H. R., Enger K. B., Monsen E., Kvellestad A., Rimstad E., Koppang E. O. Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet. Res.* 2015; 46:89. DOI: 10.1186/s13567-015-0244-6.

39. Agius C., Roberts R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish. Dis.* 2003; 26 (9): 499–509. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x.

40. Rosæg M. V., Lund M., Nyman I. B., Markussen T., Aspehaug V., Sindre H., Dahle M. K., Rimstad E. Immunological interactions between *Piscine orthoreovirus* and *Salmonid alphavirus* infections in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 64: 308–319. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.03.036.
41. Teige L. H., Lund M., Haatveit H. M., Rosæg M. V., Wessel O., Dahle M. K., Storset A. K. A bead based multiplex immunoassay detects *Piscine orthoreovirus* specific antibodies in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 2017; 63: 491–499. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.02.043.
42. Dahle M. K., Wessel O., Timmerhaus G., Nyman I. B., Jorgensen S. M., Rimstad E., Krasnov A. Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes infected with piscine orthoreovirus (PRV). *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 45 (2): 780–790. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.05.049.
43. Vendramin N., Alencar A. L. F., Iburg T. M., Dahle M. K., Wessel O., Olsen A. B., Rimstad E., Olesen N. J. *Piscine orthoreovirus* infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*) protects against subsequent challenge with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Vet. Res.* 2018; 49 (1):30. DOI: 10.1186/s13567-018-0524-z.
44. McLoughlin M. F., Graham D. A. Alphavirus infections in salmonids – a review. *J. Fish Dis.* 2007; 30 (9): 511–531. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2007.00848.x.
45. Ferguson H. W., Poppe T., Speare D. J. Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. *Dis. Aquat. Org.* 1990; 8: 225–231. Available at: <https://www.int-res.com/articles/dao/8/d008p225.pdf> (date of access 12.11.2019).
46. Mikalsen A. B., Haugland O., Rode M., Solbakk I. T., Evensen O. Atlantic salmon reovirus infection causes a CD8 T Cell myocarditis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One.* 2012; 7 (6):e37269. DOI: 10.1371/journal.pone.0037269.
47. Martinez-Rubio L., Morais S., Evensen O., Wadsworth S., Ruohonen K., Vecino J. L. G., Bell G., Tocher D. R. Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with Atlantic salmon reovirus (ASRV). *PLoS One.* 2012; 7(11):e40266. DOI: 10.1371/journal.pone.0040266.
48. Morkore T., Heia K. Black spots in salmon fillet – extent and methods of measurement. *Norsk Fiskeoppdrett.* 2012; 3: 50–53.

Поступила 27.11.2019

Принята в печать 05.02.2020

Submitted on 27.11.2019

Approved for publication on 05.02.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мельников Владимир Петрович, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией болезней аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Пронин Валерий Васильевич, доктор биологических наук, профессор, руководитель центра доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Vladimir P. Melnikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for Aquaculture Diseases FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Valery V. Pronin, Doctor of Science (Biology), Professor, Head of the Centre for Preclinical Tests FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей некоторых особо опасных вирусных болезней рыб

А. С. Тарасова¹, А. В. Перчун², В. П. Мельников³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-0387-2694, e-mail: 686778562@mail.ru

² ORCID 0000-0003-4807-4335, e-mail: perchun@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-2766-2875, e-mail: melnikov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время основной ущерб мировой аквакультуре наносят вирусные болезни рыб. Возбудители болезней часто проникают из одних рыболовных хозяйств в другие при перевозках инфицированных рыб из неблагополучных хозяйств в благополучные. Поэтому завоз рыбопосадочного материала в Россию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга и прогнозирования на основе возможных рисков. Ведущее место в комплексе мероприятий по предотвращению распространения вирусных инфекций рыб занимает диагностика. На сегодняшний день лабораторная диагностика болезней рыб вирусной природы основана на выделении возбудителя и его идентификации серологическими методами, которые требуют больших затрат времени и выполняются только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории. Более чувствительными и высокопроизводительными являются молекулярные методы диагностики. В статье представлены результаты применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией по выявлению ряда особо опасных вирусных болезней рыб семейства лососевых. В результате проделанной работы были подобраны праймеры и оптимизированы температурно-временные условия проведения реакции для идентификации инфекционного некроза гемопоэтической ткани, вирусной геморрагической септицемии и инфекционной анемии лососевых. Результаты, полученные в ходе исследований, позволили установить, что данный диагностический метод является высокоспецифичным с аналитической чувствительностью для вируса инфекционной анемии лососевых – 2,5 Ig ТЦД₅₀/см³, инфекционного некроза гемопоэтической ткани – 2,9 Ig ТЦД₅₀/см³ и вирусной геморрагической септицемии – 4,2 Ig ТЦД₅₀/см³. С помощью описанного метода была проведена идентификация референтных и полевых штаммов, имеющихся в референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» и выделенных в разные годы в рыболовческих хозяйствах на территории Российской Федерации. Данные, полученные в ходе исследований, коррелировали с результатами вирусовыделения на культуре клеток и иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов. Предложенная методика проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией позволяет обнаружить возбудителей болезней у рыб как с явными клиническими признаками, так и со скрытым вирусоносительством.

Ключевые слова: болезни рыб, инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз гемопоэтической ткани, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, специфичность, аналитическая чувствительность.

Для цитирования: Тарасова А. С., Перчун А. В., Мельников В. П. Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей некоторых особо опасных вирусных болезней рыб. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 11–16. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-11-16.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Перчун Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: perchun@arriah.ru.

UDC 619:639.3.09:577.2

Polymerase chain reaction for detection of some highly dangerous viral fish disease agents

A. S. Tarasova¹, A. V. Perchun², V. P. Melnikov³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-0387-2694, e-mail: 686778562@mail.ru

² ORCID 0000-0003-4807-4335, e-mail: perchun@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-2766-2875, e-mail: melnikov@arriah.ru

SUMMARY

Today viral fish diseases cause major losses in the world aquaculture. Pathogen spread often occurs during the transportation of fish from infected farms to the disease-free ones. Therefore, the import of fish stocking material to Russia from countries with a different epidemic situation requires risk-based monitoring and

forecasting. Diagnostics is of primary importance in the complex of measures to prevent the spread of viral infections in fish. To date, laboratory diagnostics of viral fish diseases is based on pathogen isolation and its identification using serological methods which require a lot of time and are performed only in large research institutes with specialized laboratories. Molecular diagnostic methods are more sensitive and high-performance. The article presents the results of using reverse transcription polymerase chain reaction to detect a number of highly dangerous viral diseases of fish (*Salmonidae*). As a result of this work, primers were selected and the temperature and time conditions of the reaction were optimized for the identification of infectious hematopoietic necrosis, viral hemorrhagic septicemia and infectious salmon anemia. The results obtained during the research allowed us to establish that this diagnostic method is highly specific with analytical sensitivity to infectious salmon anemia virus of $2.5 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$, to infectious hematopoietic necrosis – $2.9 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$ and to viral hemorrhagic septicemia – $4.2 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$. The described method was used to identify reference and field strains available at the FGBI ARRIAH Reference Laboratory for Aquaculture Diseases and isolated in different years in fish farms in the territory of the Russian Federation. The research data correlated with the results obtained from virus neutralization in cell culture and ELISA performed using commercial kits. The proposed method of RT-PCR allows to detect pathogens both in fish with pronounced clinical signs and in latent virus carriers.

Key words: fish diseases, infectious salmon anemia, viral hemorrhagic septicemia, infectious hematopoietic necrosis, reverse transcription polymerase chain reaction, specificity, analytical sensitivity.

For citation: Tarasova A. S., Perchun A. V., Melnikov V. P. Polymerase chain reaction for detection of some highly dangerous viral fish disease agents. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 11–16. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-11-16.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Alexey V. Perchun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher of the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: perchun@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Болезни рыб вирусной природы очень широко распространены во всем мире. Около четверти выявленных вирусов вызывают заболевания, наносящие серьезный ущерб аквакультуре. К наиболее опасным относятся инфекционный некроз гемопоэтической ткани, инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия и др.¹ Несмотря на то что большинство инфекций не представляют прямой угрозы здоровью человека, они отрицательно влияют на темп роста рыб, товарный вид, качество рыбопродукции, а также сопровождаются высокой летальностью [1].

Во всем мире главным направлением в борьбе с заразными болезнями рыб является профилактика, а именно – предотвращение проникновения патогенов в регионы, где они отсутствуют. Из этого следует, что завоз рыбопосадочного материала в Россию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга и прогнозирования на основе возможных рисков [2, 3, 4].

В комплексе мероприятий по предотвращению распространения вирусных инфекций рыб ведущее место принадлежит диагностике. На сегодняшний день лабораторная диагностика всех перечисленных заболеваний основана на выделении вируса и его идентификации серологическими методами, которые требуют больших затрат времени и выполняются только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории [1, 5].

Молекулярные методы диагностики более чувствительны и требуют меньше времени, чем культивирование и серологические методы, традиционно используемые для идентификации возбудителей вирусных заболеваний рыб. В течение последних десятилетий молекулярная диагностика заболеваний значительно продвинулась, в том числе и при выявлении заболеваний рыб. К числу таких методов относится полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая позволяет обнаружить вирус у рыб как с явными

клиническими признаками, так и со скрытым вирусоносительством².

В России отсутствуют методы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное, высокую чувствительность. На отечественном рынке предлагаются только импортные наборы и тест-системы для диагностики вирусных болезней рыб.

Целью настоящего исследования являлась оценка возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для индикации и идентификации таких особо опасных возбудителей вирусных болезней рыб семейства лососевых, как вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз гемопоэтической ткани и инфекционная анемия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали: штамм «Оренбург/14» вируса весенней виремии карповых (ВВК), штамм «Аркус 32/87» вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (ИНГТ), штамм «FLD/2004» вируса инфекционного некроза поджелудочной железы (ИНПЖ) и штамм «Аланд» вируса геморрагической септицемии лососевых (ВГС), находящиеся на хранении в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также штамм «ССВВ» вируса инфекционной анемии лососевых (ИАЛ), полученный в 2019 г. из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Выделение суммарной РНК исследуемых вирусов проводили с использованием коммерческого набора реагентов «РНК-Экстрен» («Синтол», Россия) согласно

¹ Васильков Г. В., Грищенко Л. И., Енгашев В. Г., Канаев А. И., Ларькова З. И., Осетров В. С. Болезни рыб: справочник. Под ред. В. С. Осетрова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат; 1989. 288 с.

² Воронин В. Н., Кузнецова Е. В., Стрелков Ю. А., Чернышева Н. Б. Болезни рыб в аквакультуре России: практическое руководство. СПб.: ФГБУ «ГосНИОРХ»; 2011. 264 с.

рекомендациям фирмы-производителя. Для получения кДНК на матрице выделенной РНК использовали комплект реагентов «ОТ-1» («Синтол», Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Реакционную смесь для постановки ПЦР готовили в объеме 25 мкл с использованием набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции к набору. ПЦР проводили в термоциклере «PTC-200 DNA Engine Cycler» (Bio-Rad, США). Последовательности праймеров, используемых для постановки ПЦР, были опубликованы ранее [6, 7, 8]. Праймеры были синтезированы в компании «Синтол» (Россия).

Полученные в ходе ПЦР ампликоны анализировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия (10 мг/мл) в течение 1 ч при напряжении 10 В/см в 1× трисборатном буфере. В лунку геля вносили по 15 мкл продукта ПЦР. В качестве маркера молекулярных весов использовали «M100» с шагом в 100 п. н. («Синтол», Россия) в количестве 5 мкл. По окончании электрофореза гель анализировали с помощью системы гель-документирования «Gel Doc XR+» (Bio-Rad, США).

Аналитическую чувствительность оценивали путем исследования серии последовательных десятикратных разведений кДНК, полученной из анализируемых вирусов. Пределом чувствительности считали наибольшее разведение, при котором регистрировали положительный результат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании проведенного анализа последовательностей генома исследуемых вирусов, представленных в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), и рекомендаций Всемирной организации здравоохранения животных (OIE) были выбраны праймеры к консервативным участкам 8-го сегмента вируса ИАЛ, нуклеокапсида (N) вируса ВГС и гена G вируса ИНГТ, позволяющие идентифицировать максимальное количество известных штаммов и изолятов этих вирусов. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

При проведении серии экспериментов были подобраны температурные и временные условия постановки ПЦР. При амплификации фрагмента генома вируса ИНГТ количество циклов было увеличено с 30 до 35, что позволило наработать большее число ампликонов, тем самым увеличилась чувствительность реакции. При амплификации фрагмента генома вируса ИАЛ время отжига праймеров было уменьшено с 45 до 30 с, а синтеза – с 90 до 60 с, что позволило сократить время реакции без потери ее эффективности. При амплификации фрагмента генома вируса ВГС температура отжига праймеров была увеличена с 52 до 55 °С, что позволило увеличить специфичность реакции.

Оптимизированные параметры амплификации для исследуемых инфекций представлены в таблице 2.

Специфичность подобранных праймеров была проверена экспериментально при исследовании культур после инокуляции вирусами ВВК, ВГС, ИНПЖ, ИНГТ и ИАЛ с помощью ОТ-ПЦР. Полученные после амплификации фрагменты геномов данных вирусов анализировали с помощью гель-электрофореза. Гель просматривали в коротковолновом УФ-свете (длина волны 312 нм) и результаты реакции интерпретировали по наличию или отсутствию светящихся полос.

Таблица 1

Структура праймеров для выявления возбудителей инфекционной анемии лососевых, вирусной геморрагической септицемии и инфекционного некроза гемопоэтической ткани

Table 1

Structure of primers for detection of pathogens of infectious salmon anemia, viral hemorrhagic septicemia and infectious hematopoietic necrosis

Последовательность (5' –3') праймеров	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Источник
ИАЛ		
F – GAAGAGTCAGGATGCCAAGACG	211	M. Devold et al. [6]
R – GAAGTCGATGAAGTCAGCGA		
ВГС		
F – GGGGACCCAGACTGT	811	OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [8]
R – TCTCTGTACCTTGATCC		
ИНГТ		
F – AGAGATCCCTACACCAGAGAC	693	E. J. Emmenegger et al. [7]
R – GGTGGTGTGTTCCGTGCAA		

F – forward (прямой праймер);
R – reverse (обратный праймер).

На рисунке 1 представлены электрофореграммы проведенного анализа.

Из представленных на рисунке 1 данных видно, что в лунках № 2 со штаммами вирусов ИНГТ, ИАЛ и ВГС наблюдаются четкие фрагменты на уровне 693 п. н. (а), 211 п. н. (б) и 811 п. н. (с) соответственно. В остальных лунках, включая отрицательный контроль реакции, данные фрагменты не наблюдаются, что свидетельствует о высокой специфичности подобранных праймеров для выявления возбудителей вышеперечисленных инфекций и отсутствии контаминации используемых реагентов исследуемой или посторонней РНК.

Аналитическую чувствительность оценивали путем исследования серии последовательных десятикратных разведений кДНК, полученной после проведенной

Таблица 2

Параметры амплификации

Table 2

Amplification parameters

Стадия ПЦР	Количество циклов	Температура, °С	Длительность стадии, мин
Предварительная денатурация	1	94	3
Денатурация	35	94	1/2
Отжиг праймеров		59 (ИАЛ) 50 (ИНГТ) 55 (ВГС)	1/2
Синтез	72		1
Заключительный синтез	1	72	7
Хранение	1	4	20

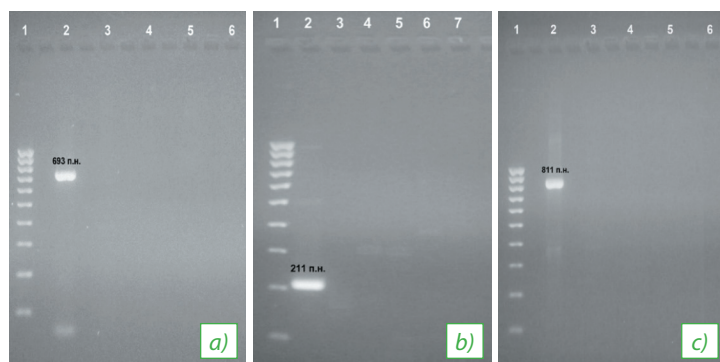


Рис. 1. Электрофореграммы результатов тестирования специфичности метода ОТ-ПЦР для выявления вирусов ИНГТ (а), ИАЛ (б) и ВГС (с)

- а) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ;
3 – штамм «Аланд» вируса ВГС;
4 – штамм «FLD/2004» вируса ИНПЖ;
5 – штамм «Оренбург/14» вируса ВВК;
6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
- б) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – штамм «ССВВ» вируса ИАЛ;
3 – штамм «Оренбург/14» вируса ВВК;
4 – штамм «Аланд» вируса ВГС;
5 – штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ;
6 – штамм «FLD/2004» вируса ИНПЖ;
7 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
- с) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – штамм «Аланд» вируса ВГС;
3 – штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ;
4 – штамм «FLD/2004» вируса ИНПЖ;
5 – штамм «Оренбург/14» вируса ВВК;
6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).

Fig. 1. Electrophoregrams showing RT-PCR specificity testing results for detection of infectious hematopoietic necrosis (IHN) (a), infectious salmon anemia (ISA)(b) and viral hemorrhagic septicemia (VHS) (c) viruses

- а) 1 – molecular weight markers "M100";
2 – Arcus 32/87 strain of the IHN virus;
3 – Aland strain of the VGS virus;
4 – FLD/2004 strain of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus;
5 – Orenburg/14 strain of the spring viraemia of carp (SVC) virus;
6 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
- б) 1 – molecular weight markers "M100";
2 – CCBB strain of the infectious salmon anemia (ISA) virus;
3 – Orenburg/14 strain of the spring viraemia of carp (SVC) virus;
4 – Aland strain of the VGS virus;
5 – Arcus 32/87 strain of the IHN virus;
6 – FLD/2004 strain of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus;
7 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
- с) 1 – molecular weight markers "M100";
2 – Aland strain of the VGS virus;
3 – Arcus 32/87 strain of the IHN virus;
4 – FLD/2004 strain of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus;
5 – Orenburg/14 strain of the spring viraemia of carp (SVC) virus;
6 – negative control (sterile water free of RNase and DNase).

реакции обратной транскрипции с выделенной РНК, произведенной из культуральных штаммов вирусов ИАЛ, ВГС и ИНГТ с исходным титром их инфекционной активности 5,5; 7,2 и 6,9 lg TC₅₀/см³ соответственно. Пределом чувствительности считали наибольшее

разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанные значения аналитической чувствительности оптимизированной ПЦР составили 2,5 lg TC₅₀/см³ для вируса ИАЛ, 2,9 lg TC₅₀/см³ для вируса ИНГТ и 4,2 lg TC₅₀/см³ для вируса ВГС.

Результаты тестирования аналитической чувствительности представлены на рисунке 2 и в таблице 3.

Таким образом, предложенный метод ОТ-ПЦР позволяет выявлять вирусы ИАЛ, ИНГТ и ВГС с минимальным титром инфекционной активности 2,5; 2,9 и 4,2 lg TC₅₀/см³ соответственно. Специфичность подобранных праймеров была проверена с помощью программы BLAST, а также экспериментально. Результаты ПЦР, представленные на рисунке 1, показали, что выбранные праймеры гибридизуются только с фрагментами, комплементарными искомым вирусам, и не взаимодействуют с РНК других вирусов.

С помощью описанного метода была проведена идентификация референтных и полевых штаммов, имеющих в референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» и выделенных в разные годы в рыбоводческих хозяйствах на территории Российской Федерации. Данные, полученные в ходе исследований с применением ОТ-ПЦР, коррелировали с результатами, полученными методом вирусыведения на культуре клеток и методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирм-производителей TestLine Clinical Diagnostics Ltd (Чехия) и Bio-X Diagnostics S.A. (Бельгия).

Представленные в статье результаты по использованию классической ОТ-ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле хоть и подтверждают эффективность данного диагностического метода, проверенного временем, но все же он уступает более современным молекулярно-генетическим методам диагностики, таким как ОТ-ПЦР в режиме реального времени и ОТ-ПЦР в формате микрочипов. Основными преимуществами последних двух методов являются: большая чувствительность, меньшие затраты времени на постановку и проведение самой реакции, а также снижение контаминации в связи с отсутствием стадии гель-электрофореза. Несмотря на ряд преимуществ ОТ-ПЦР в режиме реального времени, данный метод в нашей стране при диагностике вирусных болезней рыб не получил широкого распространения и был реализован только М. И. Дорониным с соавт. совместно с сотрудниками компании ООО «Люмэкс-маркетинг» (г. Санкт-Петербург) при выявлении ИНГТ и ВГС [9].

Отметим, что в России данные по использованию метода ОТ-ПЦР в диагностике таких вирусных болезней рыб, как ИНГТ, ВГС и ИАЛ, малочисленны. Имеется лишь ограниченное число публикаций по разработке и использованию этого молекулярно-генетического метода [2, 9, 10, 11], в то время как за рубежом он получил широкое распространение. Во многих странах избирательная амплификация отдельных участков вирусного генома с помощью ПЦР с последующим секвенированием используется не только для диагностики вирусов ИНГТ, ВГС и ИАЛ, но и для разработки методов по их типированию [12, 13, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были подобраны праймеры и оптимизированы температурно-временные условия проведения ПЦР для выявления

Таблица 3
Результаты определения аналитической чувствительности оптимизированной ОТ-ПЦР

Table 3
Determination of optimized RT-PCR analytical sensitivity

№ п/п	Разведение	Титр инфекционной активности вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$	Результат ОТ-ПЦР
ИАЛ			
1	исходный образец	5,5	+
2	10^{-1}	4,5	+
3	10^{-2}	3,5	+
4	10^{-3}	2,5	+
5	10^{-4}	1,5	–
6	10^{-5}	0,5	–
ИНГТ			
1	исходный образец	6,9	+
2	10^{-1}	5,9	+
3	10^{-2}	4,9	+
4	10^{-3}	3,9	+
5	10^{-4}	2,9	+
6	10^{-5}	1,9	–
ВГС			
1	исходный образец	7,2	+
2	10^{-1}	6,2	+
3	10^{-2}	5,2	+
4	10^{-3}	4,2	+
5	10^{-4}	3,2	–
6	10^{-5}	2,2	–

«+» – положительный результат реакции;

«–» – отрицательный результат реакции.

таких вирусных болезней рыб, как вирусная геморрагическая септицемия, инфекционный некроз гемопоэтической ткани и инфекционная анемия лососевых.

Показано, что данный диагностический метод является высокоспецифичным и имеет аналитическую чувствительность $2,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$ при выявлении вируса инфекционной анемии лососевых, $2,9 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$ – вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани и $4,2 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$ – вируса вирусной геморрагической септицемии. Метод ОТ-ПЦР позволил сократить время проведения анализа до 5 ч, в то время как «золотой» стандарт – вирусывыделение – занимает несколько недель.

Предложенная ОТ-ПЦР может быть использована для выявления вирусов ИАЛ, ИНГТ и ВГС при мониторинговых исследованиях проб патологического материала от рыб семейства лососевых. Особенностью данной реакции является то, что она позволяет выявить инфицированных рыб до появления клинических

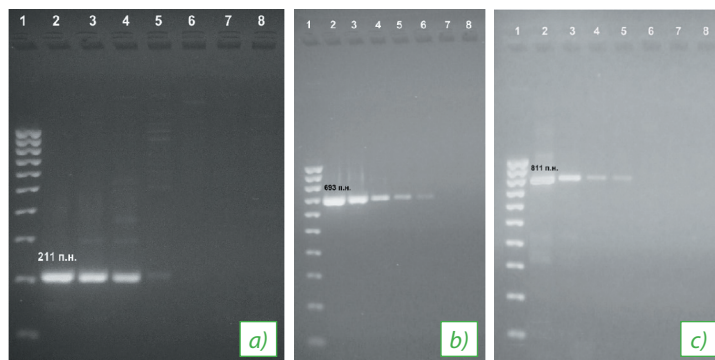


Рис. 2. Электрофореграммы результатов тестирования аналитической чувствительности ПЦР для выявления вирусов ИАЛ (а), ИНГТ (б) и ВГС (с)

- а) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – исходный образец (штамм «ССВВ» вируса ИАЛ);
3–7 – серия десятикратных разведений штамма «ССВВ» вируса ИАЛ (10^{-1} – 10^{-5});
8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
б) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – исходный образец (штамм «Аркус 32/87» вируса ИНГТ);
3–7 – серия десятикратных разведений штамма «Аркус 32/87» вируса ИНГТ (10^{-1} – 10^{-5});
8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз);
с) 1 – маркер молекулярных весов «М100»;
2 – исходный образец (штамм «Аланд» вируса ВГС);
3–7 – серия десятикратных разведений штамма «Аланд» вируса ВГС (10^{-1} – 10^{-5});
8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).

Fig. 2. Electrophoregrams showing PCR analytical sensitivity testing results for detection of ISA (a), INGV (b) and HCV (b) viruses

- а) 1 – molecular weight markers “M100”;
2 – original sample (CCBB strain of the ISA virus);
3–7 – a series of ten-fold dilutions of CCBB strain of the ISA virus (10^{-1} – 10^{-5});
8 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
б) 1 – molecular weight markers “M100”;
2 – original sample (Arcus 32/87 strain of the IHNV virus);
3–7 – a series of ten-fold dilutions of CCBB strain of the ISA virus (10^{-1} – 10^{-5});
8 – negative control (sterile water free of RNase and DNase);
с) 1 – molecular weight markers “M100”;
2 – original strain (Aland strain of the VGS virus);
3–7 – a series of ten-fold dilutions of Aland strain of the VGS virus (10^{-1} – 10^{-5});
8 – negative control (sterile water free of RNase and DNase).

признаков, в случае скрытого вирусоносительства, что особенно важно при трансграничных перевозках гидробионтов.

По результатам проведенных исследований были подготовлены и утверждены на ученом совете ФГБУ «ВНИИЗЖ» методические рекомендации по выявлению возбудителей ИНГТ, ВГС и ИАЛ методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 6–8, 11–14 см. REFERENCES)

- Павлов Д. К., Пичуева А. А. Анализ эпизоотической ситуации в мире по вирусным болезням рыб. *Ветеринария сегодня*. 2015; 2 (13): 54–58. Режим доступа: <https://veterinary.aria.ru/jour/article/view/196>.
- Завьялова Е. А., Кандрин Н. Ю., Ломакина Н. Ф., Гулюкин М. И. Идентификация и идентификация некоторых особо опасных вирусов рыб методом ПЦР. *Рыбоводство и рыбное хозяйство*. 2015; 3: 21–25. eLIBRARY ID: 23833996.

3. Рахконен Р., Веннерстрем П., Ринтамяки П., Каннел Р. Здоровая рыба – профилактика, диагностика и лечение болезни. 2-е изд., перераб. и доп. Хельсинки: НИИ охотничьего и рыбного хозяйства Финляндии; 2013. 177 с. Режим доступа: <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/537337/Terve%20kala.rus.pdf?sequence=1>.

4. Щелканов М. Ю., Шульгина М. А., Степанков А. П., Львов Д. Н., Какарека Н. Н., Шестопалов А. М., Галкина И. В., Шевченко О. Г. Инфекционная анемия лососевых. *Юг России: экология, развитие*. 2017; 12 (2): 120–134. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-2-120-134.

5. Жигалева О. Н., Колбасова О. Л., Цыбанов С. Ж., Колбасов Д. В., Щелкунов И. С., Щелкунова Т. И. Выявление РНК возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом ПЦР. *Ветеринария*. 2006; 9: 24–26. eLIBRARY ID: 9242745.

9. Доронин М. И., Котова Е. В., Никитин М. М., Мудрак Н. С. Одновременная идентификация вирусов лососевых рыб с помощью метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в формате микрочипов. *Молекулярная диагностика 2017: сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. Под ред. В. И. Покровского. Т. 2. Тамбов: ООО «Фирма Юлис», 2017; 367–368. Режим доступа: https://kpfu.ru/staff_files/F1634184337/Tom_2_s_oblozhkoj.pdf.

10. Попова А. Г., Орешкова С. Ф., Щелкунов И. С., Рудакова С. Л., Щелкунова Т. И., Тикункина Н. В., Блинова Н. Н., Ильичев А. А. Методы идентификации и типирования вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб на основе ОТ-ПЦР. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53 (3): 39–43. eLIBRARY ID: 11519442.

REFERENCES

1. Pavlov D. K., Pichuyeva A. A. Analysis of fish viral disease epidemic situation worldwide. *Veterinary Science Today*. 2015; 2 (13): 54–58. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/196>. (in Russian)

2. Zavyalova E. A., Kandrina N. Yu., Lomakina N. F., Gulyukin M. I. Indication and indication of dangerous and quarantine fish diseases based on reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR). *Rybovodstvo i rybnoe hozyajstvo*. 2015; 3: 21–25. eLIBRARY ID: 23833996. (in Russian)

3. Rahkonen R., Wennerstrom P., Rintamaki P., Kannell R. Healthy fish-prevention, diagnosis and treatment of the disease. 2nd ed., revised. Helsinki: Finnish Game and Fisheries Research Institute; 2013. 177 p. Available at: <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/537337/Terve%20kala.rus.pdf?sequence=1>. (in Russian)

4. Shchelkanov M. Y., Shulgina M. A., Stepan'kov A. P., Lvov D. N., Kakareka N. N., Shestopalov A. M., Galkina I. V., Shevchenko O. G. Infectious Salmon anemia. *South of Russia: ecology, development*. 2017; 12 (2): 120–134. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-2-120-134. (in Russian)

5. Zhigalyeva O. N., Kolbasova O. L., Tsybanov S. Zh., Kolbasov D. V., Schelkunov I. S., Schelkunova T. I. Differentiation of RNA of the virus for fish

haemorrhagic septicemia with the PCR method. *Veterinariya*. 2006; 9: 24–26. eLIBRARY ID: 9242745. (in Russian)

6. Devold M., Krossøy B., Aspehaug V., Nylund A. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Organ*. 2000; 40 (1): 9–18. DOI: 10.3354/dao040009.

7. Emmenegger E. J., Meyers T. R., Burton T. O., Kurath G. Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Organ*. 2000; 40 (3): 163–176. DOI: 10.3354/dao040163.

8. Viral haemorrhagic septicaemia. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. OIE. 2019. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_vhs.pdf.

9. Doronin M. I., Kotova E. V., Nikitin M. M., Mudrak N. S. Simultaneous identification of salmon viruses using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) in microchip format [Odnovremennaya identifikatsiya virusov lososyevykh ryb s pomoshch'yu metoda obratnoy transkripcii i polimeraznoy cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni (OT-PCR-RV) v formate mikrochipov]. *Molecular diagnostics 2017: Proceedings of the IX all-Russian scientific and practical conference with international participation*. Ed. by V. I. Pokrovsky. Vol. 2. Tambov: ООО «Юлис», 2017; 367–368. Available at: https://kpfu.ru/staff_files/F1634184337/Tom_2_s_oblozhkoj.pdf. (in Russian)

10. Popova A. C., Oreshkova S. F., Shchelkunov I. S., Rudakova S. L., Shchelkunova T. I., Tikunova N. V., Blinova N. N., Ilyichov A. A. RT-PCR-based methods for identification and typing of infectious hemopoietic necrosis virus in salmon. *Voprosy Virusologii*. 2008; 53 (3): 39–43. eLIBRARY ID: 11519442. (in Russian)

11. Rudakova S. L., Kurath G., Bochkova E. V. Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia. *Dis. Aquat. Organ*. 2007; 75 (1): 1–11. DOI: 10.3354/dao075001.

12. Einer-Jensen K., Ahrens P., Lorenzen N. Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Organ*. 2005; 67 (1–2): 39–45. DOI: 10.3354/dao067039.

13. Johansson T., Einer-Jensen K., Batts W., Ahrens P., Björklund C., Kurath G., Björklund H., Lorenzen N. Genetic and serological typing of European infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Organ*. 2009; 86 (3): 213–221. DOI: 10.3354/dao02108.

14. Kibenge M. J., Iwamoto T., Wang Y., Morton A., Routledge R., Kibenge F. S. Discovery of variant infectious salmon anaemia virus (ISAV) of European genotype in British Columbia, Canada. *Virol. J*. 2016; 13:3. DOI: 10.1186/s12985-015-0459-1.

Поступила 09.12.19

Принята в печать 03.03.20

Received on 09.12.19

Approved for publication on 03.03.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тарасова Алена Сергеевна, аспирант референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Перчун Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Мельников Владимир Петрович, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Alyona S. Tarasova, Post-Graduate Student of the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey V. Perchun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher at the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vladimir P. Melnikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Reference Laboratory for Aquaculture Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Влияние мирамистина на пролиферацию клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 и репродукцию вируса ящура в них

М. И. Доронин¹, Д. А. Лозовой², В. В. Пронин³, Д. В. Михалишин⁴, В. А. Стариков⁵, А. В. Борисов⁶, А. А. Шишкова⁷

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-6240-3062, e-mail: pronin@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

⁷ e-mail: shishkova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в ветеринарной практике применяется препарат мирамистин (бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммоний хлорид моногидрат), обладающий широким бактерицидным действием. Данный антисептик активен против большинства вирусов, микоплазм, бактерий, грибов и простейших. По параметрам токсикометрии мирамистин классифицируется как малоопасное вещество. Использование клеточных структур в качестве тест-систем для оценки токсичности фармакологических веществ вместо классических тестов на экспериментальных животных позволяет лучше прояснить возможный механизм действия исследуемого вещества. Поскольку многие виды микоплазм поражают органы мочеполовой системы, для оценки цитотоксичности мирамистина в качестве тест-систем можно использовать клетки почек разных млекопитающих, в частности новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), сибирского горного козорога (ПСГК-30) и другие. Показана возможность применения монослойных клеточных ВНК-21 и ПСГК-30 в качестве тест-систем для оценки базовой цитотоксичности мирамистина. В процессе исследования токсичности препарата изучали влияние его различных концентраций на морфологию клеток, определяли количество жизнеспособных клеток и содержание общего белка как показателя прироста клеточной массы. Результаты цитоморфологического исследования свидетельствуют о том, что предельной допустимой концентрацией мирамистина для монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 является 25 мкг/см³. Применение данного антибактериального препарата в больших концентрациях вызывало появление и нарастание признаков эндогенной интоксикации и дегенерации. При оценке пролиферативной активности клеток под влиянием антибиотика мирамистина в разных концентрациях выявлено, что увеличение дозы препарата до 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ приводит к снижению кратности прироста клеток по сравнению с контролем. Содержание в ростовой среде мирамистина в количестве до 25 мкг/см³ не влияло на интенсивность синтеза протеинов. Наличие в культуральной среде мирамистина в предельно допустимой концентрации вызывает незначительное снижение репродукции вируса ящура в культурах клеток ВНК-21 и ПСГК-30 на 4,5 и 4,0% соответственно по сравнению с контролем без антибиотика. Поскольку микоплазмы являются наиболее распространенными контаминантами клеточных культур, дальнейшие исследования будут направлены на изучение возможности применения мирамистина для деконтаминации монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30.

Ключевые слова: мирамистин, монослойные клеточные линии ВНК-21, ПСГК-30, микоплазма.

Для цитирования: Доронин М. И., Лозовой Д. А., Пронин В. В., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Борисов А. В., Шишкова А. А. Влияние мирамистина на пролиферацию клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 и репродукцию вируса ящура в них. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 17–24.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-17-24.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

Miramistin effect on BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferation and FMD virus reproduction in these cells

M. I. Doronin¹, D. A. Lozovoy², V. V. Pronin³, D. V. Mihalishin⁴, V. A. Starikov⁵, A. V. Borisov⁶, A. A. Shishkova⁷

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-6240-3062, e-mail: pronin@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru⁷ e-mail: shishkova@arriah.ru

SUMMARY

At present, Miramistin drug (benzylidimethyl [3-(myristoylamino) propyl] ammonium chloride monohydrate), which has a broad bactericidal effect, is used in veterinary practice. This antiseptic is active against most viruses, mycoplasmas, bacteria, fungi and protozoa. According to toxicometric parameters, Miramistin is classified as a low-hazard substance. Use of cell structures as test systems for assessing the toxicity of pharmacological substances instead of conventional tests on experimental animals allows us to better clarify the possible mechanism of the effect of the investigated substance. Since many types of mycoplasmas affect the genitourinary system organs, to assess the cytotoxicity of Miramistin kidney mammalian cells of various mammals can be used as test systems, in particular, the newborn Syrian hamster (VNK-21), Siberian mountain ibex (PSGK-30), and others. The possibility of using BHK-21 and PSGK-30 cell monolayer as test systems for assessing the baseline cytotoxicity of Miramistin was shown. When studying toxicity of the drug, the effect of its various concentrations on the cell morphology was studied, the number of viable cells and the total protein content were determined as an indicator of the cell mass increase. The results of a cytomorphological study indicate that the Miramistin maximum permissible concentration of for BHK-21 and PSGK-30 cell monolayer is 25 µg/cm³. The use of this antibacterial drug in higher concentrations caused the appearance and increased signs of endogenous intoxication and degeneration. When evaluating the proliferative activity of cells under the influence of the Miramistin antibiotic in different concentrations, it was found that increasing the dose to 50, 75, 100, 125, 150 µg/cm³ leads to decrease in the rate of cell growth compared to the control. The Miramistin content in the growth medium in an amount of up to 25 µg/cm³ did not affect the intensity of protein synthesis. Presence of Miramistin in the culture medium at the maximum permissible concentration causes a slight decrease in the reproduction of foot and mouth disease virus in BHK-21 and PSGK-30 cell cultures by 4.5 and 4.0%, respectively, compared with the control without antibiotic. Since mycoplasmas are the most common contaminants of cell cultures, further studies will be aimed at exploring the possibility of using Miramistin for decontamination of BHK-21 and PSGK-30 cell monolayers.

Key words: Miramistin, BHK-21 and PSGK-30 cell monolayers, Mycoplasma.

For citation: Doronin M. I., Lozovoy D. A., Pronin V. V., Mikhailishin D. V., Starikov V. A., Borisov A. V., Shishkova A. A. Miramistin effect on BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferation and FMD virus reproduction in these cells. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 17–24. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-17-24.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмозы животных – группа инфекционных заболеваний, вызываемых микроорганизмами типа *Tenericutes*, класса *Mollicutes*, семейства *Mycoplasmataceae*, рода *Mycoplasma*. Микоплазмы являются наиболее распространенными контаминантами клеточных культур. Данные прокариотические микроорганизмы плотно прилегают к клеточной мембране, получают из нее различные питательные вещества и ростовые факторы. Метаболиты микоплазм, в том числе перекись водорода и аммиак, накапливаются в культуральной среде и могут оказывать выраженное цитопатическое действие [1, 2, 3]. Микоплазмы вызывают существенные метаболические нарушения в клетках, следствием этого могут быть изменения уровня синтеза РНК и белков, состава клеточной мембраны, появление хромосомных aberrаций, индукция или активация экспрессии цитокинов, резкое снижение пролиферативной активности [4]. Необратимые изменения в клетках, вызываемые влиянием микоплазм и продуктов их жизнедеятельности, приводят к искажению результатов лабораторных исследований, в которых клеточные линии применяют в качестве тест-систем.

Микоплазмы устойчивы к сульфониламидам, пенициллинам, стрептомицину, но чувствительны к антибиотикам тетрациклинового ряда, макролидам и фторхинолонам [1, 3]. В настоящее время в ветеринарной практике применяется препарат мирамистин (бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммоний хлорид моногидрат), обладающий широким бактерицидным действием. Лекарственный препарат относится

к группе катионных поверхностно-активных веществ, а именно к четвертичным аммониевым соединениям. По параметрам токсикометрии мирамистин классифицируется как малоопасное вещество¹. Препарат активен против большинства вирусов, бактерий, грибов и простейших. Механизм действия мирамистина проявляется в процессе активного взаимодействия данного соединения с липидами и полисахаридами цитоплазматической мембраны микоплазм, приводящего к их гибели [2, 5].

Анализ способности микроорганизмов размножаться и расти на средах, содержащих уменьшающуюся концентрацию лекарственного вещества, позволяет определить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотика², угнетающую жизнь микоплазм *in vitro*. По данным А. М. Дунаевского и соавт., МИК для мирамистина составляет 10–100 мкг/см³ [6].

Исследование биологической активности антибиотиков предполагает оценку их цитотоксичности, которая проявляется в возникновении патологических изменений в клетках [1]. В зависимости от концентрации действующего вещества и восприимчивости клеточных рецепторов возможен широкий спектр изменений на уровне клетки, которые могут проявляться в виде цитостатического эффекта либо в форме цитотоксического действия, вызывающего ее гибель [4].

¹ ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. М.: Стандартинформ; 2007. 5 с.

² Арфьев В. А., Лисовенко Л. А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов. М.: ВНИРО; 1995. 407 с.

Для оценки токсичности фармакологических веществ в настоящее время вместо классических тестов на экспериментальных животных широко применяют тест-системы с использованием монослойных культур клеток [5, 7, 8]. Поскольку большое количество видов микоплазм поражают органы мочеполовой системы, для оценки цитотоксичности мирамистина в качестве тест-систем используют клетки, полученные из почек разных млекопитающих, в частности новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21), сибирского горного козерога (ПСГК-30) и другие. Для исследования цитотоксичности антибиотиков в культуре клеток применяют широкий спектр методов, в том числе определение количества жизнеспособных клеток, колониеобразование, измерение концентрации общего клеточного белка, оценку морфологических изменений клеток и другие [8].

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния мирамистина на пролиферацию клеток ВНК-21 и ПСГК-30, а также на репродукцию вируса ящура в них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антибиотик. Для анализа применяли антибиотик мирамистин (ООО «Скандия Эко», Россия) с концентрациями в культуральной среде 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 и 150 мкг/см³. В работе использовали 4 контроля: № 1 – тетрациклин (5 мкг/см³); № 2 – спирамицин (10 мкг/см³); № 3 – ципрофлоксацин (18 мкг/см³) [9]; № 4 – контроль, представляющий собой клеточную суспензию в ростовой среде без внесения антибиотиков.

Тест-системы. Для оценки базовой цитотоксичности мирамистина в качестве тест-системы применяли монослойные культуры клеток ВНК-21 и ПСГК-30, свободные от микоплазмы.

Количественный метод оценки действия мирамистина на культуры клеток. Действие мирамистина на монослойные клеточные линии ВНК-21 и ПСГК-30 оценивали по жизнеспособности клеток на протяжении трех последовательных пассажей. Анализ заключался в подсчете количества живых и мертвых клеток после диспергирования монослоя смесью трипсина и версена (1:1) при температуре 37 °С. Интенсивность роста оценивали по кратности прироста (K_{np}), используя формулу:

$$K_{np} = a/b,$$

где a – концентрация живых клеток через 48 ч после посева;

b – посевная концентрация.

Если $K_{np} > 1$, то отмечается клеточный прирост, при $K_{np} = 1$ пролиферации клеток не наблюдается, при $K_{np} < 1$ наблюдается гибель клеток.

Спектрофотометрический метод оценки пролиферации клеток с использованием генцианвиолета. Клетки ВНК-21 и ПСГК-30 высевали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 250–300 клеток на лунку. Мирамистин в заданных концентрациях добавляли в ростовые среды во время посева клеток. Контролем служили клетки без антибиотиков, а также клетки с тетрациклином, спирамицином и ципрофлоксацином в указанных выше концентрациях. Через 48 ч культивирования клетки фиксировали 70%-м раствором этанола и окрашивали 0,1%-м раствором генцианвиолета. Для экстрагирования красителя из клеток использовали 7%-й раствор уксусной кислоты в объеме 200 мкл на лунку. Интенсивность пролиферативной ак-

тивности клеток определяли по значению оптической плотности для суспензии генцианвиолета, связанного с клеточными протеинами, при длине волны 570 нм.

Качественная оценка жизнеспособности клеток заключалась в прижизненном визуальном наблюдении под инвертированным микроскопом за морфологическим состоянием клеток спустя 2 сут культивирования с использованием изотонического 0,4%-го водного раствора трипанового синего.

Вirus. Матровый вирус ящура штамма А/Забайкальский/2013, полученный в культуре клеток ПСГК-30 на 5-м пассаже, использовали в качестве посевного материала для заражения представленных монослойных клеточных линий в дозе 0,05 ТЦД₅₀/кл. Репродукцию вируса проводили в течение 15–17 ч до появления 95–100%-го цитопатического действия.

Определение концентрации 146S компонента вируса ящура. Количество 146S частиц вируса ящура в инактивированном материале определяли с помощью количественного варианта реакции связывания комплемента [10].

Статистическая обработка данных. Исследование проводили в трех повторностях. Полученные данные статистически обрабатывали, вычисляя средние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования оценивали базовую цитотоксичность мирамистина в монослойных клеточных линиях ВНК-21 и ПСГК-30, которые широко применяются в качестве диагностических тест-систем в ветеринарной практике. Выбор концентрации антибиотика для эксперимента базировался на данных его клинических испытаний [2, 3], а также на результатах анализа МИК мирамистина в отношении микоплазм, которая находится в диапазоне 10–100 мкг/см³ [2, 3, 6]. Исходя из этого, были подобраны следующие тестируемые концентрации мирамистина: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³. Культивирование клеток с представленными количествами данного препарата осуществляли в течение трех последовательных пассажей.

Проводили оценку цитоморфологических различий в контрольных и опытных образцах. Клетки без антибиотиков, а также выращенные в средах с тетрациклином (5 мкг/см³), спирамицином (10 мкг/см³), ципрофлоксацином (18 мкг/см³) имели выраженную цитоплазматическую мембрану, четкую оболочку ядра, прозрачную гомогенную цитоплазму (рис. 1). Через 48 ч после посева по итогам каждого пассажа в контрольных образцах клеточные клоны были плотными и образованы более 100 клетками. Наиболее близким к контролю по данным морфологическим признакам были клетки ВНК-21 и ПСГК-30 с содержанием в среде мирамистина 5, 10 и 25 мкг/см³. Для данных вариантов клоны были плотными и сформированы из 85–100 клеток. Клоны клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 в результате культивирования в среде с мирамистином в концентрациях 50, 75, 100, 125 мкг/см³ по сравнению с контролем без антибиотика имели более рыхлое строение и состояли из 65–75, 45–60, 25–40, 15–25 клеток соответственно.

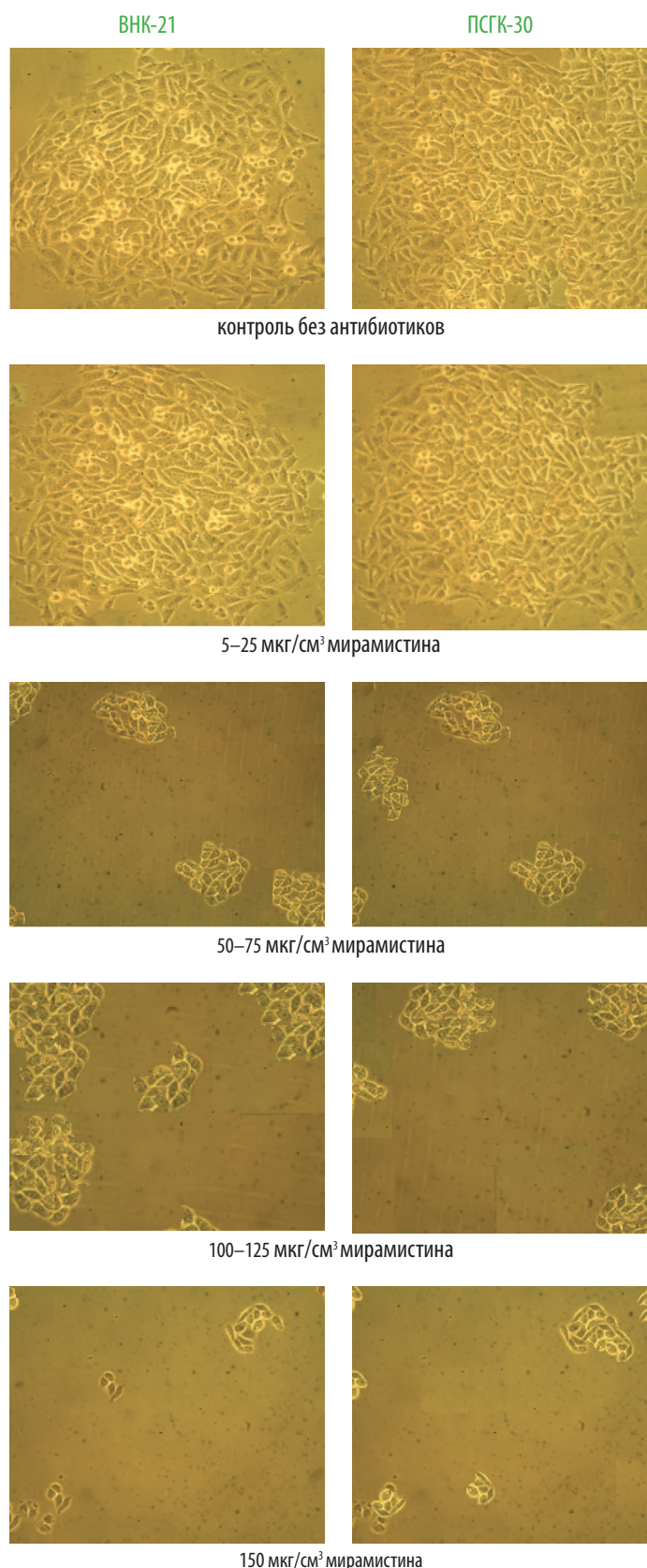


Рис. 1. Морфология клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 в клонах, образовавшихся через 48 ч культивирования в среде с мирамистином в различных концентрациях

Fig. 1. Morphology of BHK-21 and PSGK-30 cell lines in clones, formed in 48 hours of cultivation in the medium supplemented with different Miramistin concentrations

При использовании 150 мкг/см³ мирамистина клоны были сформированы из единичных клеток, характеризующихся значительной гранулярностью и повышенным количеством лизосом. Представленные морфологические изменения были результатом локальной цитоплазматической дегенерации, развивающейся в клетке под влиянием такого токсического фактора, как избыточное количество мирамистина. Иными словами, результаты цитоморфологического исследования свидетельствуют о том, что предельной допустимой концентрацией мирамистина для монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 является 25 мкг/см³. Применение данного антибактериального препарата в больших концентрациях вызывало появление и нарастание признаков эндогенной интоксикации и дегенерации.

Проводили исследование влияния мирамистина в тестируемых концентрациях на кратность прироста клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 по итогам трех последовательных пассажей в сравнении с контролями. Полученные результаты отражены в таблице и на рисунке 2.

Из данных, представленных в таблице, следует, что кратность прироста клеток линии ВНК-21 в контроле без антибиотика составляла $2,18 \pm 0,16$, в контролях с антибиотиками – $2,17 \pm 0,19$ – $2,18 \pm 0,17$. При применении мирамистина в количествах 5–25 мкг/см³ данный показатель соответствовал значениям $2,17 \pm 0,19$ – $2,18 \pm 0,16$. Увеличение дозы препарата до 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ приводило к снижению кратности прироста клеток по сравнению с контролем в 4,6; 5,4; 7,5; 10,9 и 21,7 раза соответственно. При наличии в ростовой среде 150 мкг/см³ данного антибиотика отмечали заметную клеточную гибель. Таким образом, в результате исследования пролиферации клеток ВНК-21 определили, что мирамистин в концентрациях до 25 мкг/см³ не провоцирует возникновения цитотоксических проявлений.

Для клеток линии ПСГК-30 кратность прироста в контроле без антибиотика составляла $2,00 \pm 0,15$, в среде с контрольными антибиотиками – $1,88 \pm 0,15$ – $1,97 \pm 0,14$. Пролиферативный потенциал у клеток ПСГК-30 при использовании мирамистина в концентрациях 5–25 мкг/см³ находился на уровне контроля и был равен $1,93 \pm 0,18$ – $1,97 \pm 0,15$. При содержании данного антибиотика в среде в количествах 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ кратность прироста клеток по сравнению с контролем снижалась в 4,9; 5,3; 6,8; 10,0 и 21,1 раза соответственно. При наличии в ростовой среде 150 мкг/см³ мирамистина наблюдали гибель клеток. Таким образом, при оценке кратности прироста в сравнении с контрольными показателями выявлено, что выращивание монослойной клеточной линии ПСГК-30 в среде с содержанием мирамистина до 25 мкг/см³ не оказывало цитотоксического действия.

Оценку пролиферации клеток проводили также по относительному определению количества общего клеточного белка спектрофотометрическим методом. Результаты исследования представлены на рисунке 3, из которого следует, что содержание протеинов клеток ВНК-21, выращенных в среде с 5, 10, 25 мкг/см³ мирамистина, соответствовало контрольным показателям оптической плотности и составило 0,57–0,59. При наличии указанного антибиотика в среде в концентрациях 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ количество клеточных протеинов по сравнению с контролем снижалось в 4,3; 5,1; 8,0; 11,2 и 18,7 раза соответственно (оптическая плотность

Таблица
Оценка пролиферативной активности клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 под влиянием антибиотика мирамистина в разных концентрациях ($n = 3, p < 0,05$)

Table
Assessment of BHK-21 and PSGK-30 cell line proliferative activity influenced by different Miramistin concentrations ($n = 3, p < 0,05$)

Клеточная линия	Номер пассажа	Кратность прироста клеток											
		в среде с мирамистином с разными концентрациями (мкг/см ³)								контроль			
										с антибиотиками			б/а
		5	10	25	50	75	100	125	150	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
ВНК-21	1	2,21 ± 0,15	2,17 ± 0,17	2,22 ± 0,14	0,45 ± 0,15	0,40 ± 0,14	0,31 ± 0,13	0,22 ± 0,13	0,10 ± 0,15	2,22 ± 0,16	2,20 ± 0,17	2,22 ± 0,20	2,23 ± 0,19
	2	2,18 ± 0,15	2,20 ± 0,20	2,10 ± 0,15	0,47 ± 0,17	0,40 ± 0,14	0,29 ± 0,14	0,20 ± 0,12	0,09 ± 0,14	2,20 ± 0,20	2,22 ± 0,20	2,10 ± 0,13	2,10 ± 0,15
	3	2,15 ± 0,18	2,15 ± 0,21	2,20 ± 0,14	0,49 ± 0,11	0,40 ± 0,11	0,29 ± 0,11	0,18 ± 0,11	0,11 ± 0,11	2,12 ± 0,19	2,10 ± 0,19	2,20 ± 0,20	2,20 ± 0,14
	$M \pm m$	2,18 ± 0,16	2,17 ± 0,19	2,17 ± 0,14	0,47 ± 0,14	0,40 ± 0,14	0,29 ± 0,13	0,20 ± 0,13	0,10 ± 0,12	2,18 ± 0,17	2,17 ± 0,19	2,17 ± 0,17	2,18 ± 0,16
ПСГК-30	1	1,90 ± 0,14	2,01 ± 0,15	1,95 ± 0,12	0,37 ± 0,18	0,35 ± 0,18	0,30 ± 0,18	0,18 ± 0,18	0,10 ± 0,16	1,80 ± 0,17	2,03 ± 0,15	1,95 ± 0,14	1,95 ± 0,14
	2	1,98 ± 0,17	1,90 ± 0,21	2,00 ± 0,15	0,39 ± 0,21	0,34 ± 0,17	0,28 ± 0,16	0,19 ± 0,12	0,09 ± 0,17	2,00 ± 0,15	1,81 ± 0,20	2,06 ± 0,16	2,05 ± 0,15
	3	2,02 ± 0,17	1,88 ± 0,17	1,90 ± 0,16	0,40 ± 0,17	0,39 ± 0,17	0,27 ± 0,17	0,20 ± 0,12	0,09 ± 0,13	1,92 ± 0,14	1,80 ± 0,17	1,90 ± 0,14	2,00 ± 0,15
	$M \pm m$	1,97 ± 0,15	1,93 ± 0,18	1,95 ± 0,15	0,39 ± 0,19	0,36 ± 0,16	0,28 ± 0,13	0,19 ± 0,11	0,09 ± 0,13	1,91 ± 0,15	1,88 ± 0,15	1,97 ± 0,14	2,00 ± 0,15

№ 1 – тетрациклин (5 мкг/см³), № 2 – спирамицин (10 мкг/см³), № 3 – ципрофлоксацин (18 мкг/см³), № 4 – без антибиотика (б/а).

составляла 0,13; 0,11; 0,07; 0,05; 0,03). Таким образом, по итогам определения количества общего клеточного белка относительно контроля выявлено, что выращивание монослойной клеточной линии ВНК-21 в среде с содержанием мирамистина до 25 мкг/см³ не снижало интенсивности синтеза протеинов.

Количество синтезированного общего белка клеток ПСГК-30, выращенных в среде с 5, 10, 25 мкг/см³ мирамистина, находилось на уровне контрольных значений (оптическая плотность составляла 0,58–0,60). При со-

держании в среде указанного антибиотика в концентрациях 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³ количество клеточного белка по сравнению с контролем снижалось в 4,8; 5,3; 7,3; 9,7 и 19,3 раза соответственно (оптическая плотность составляла 0,12; 0,11; 0,08; 0,06; 0,03). Иными словами, по итогам анализа содержания клеточного белка относительно контроля определено, что культивирование монослойной клеточной линии ПСГК-30 в среде с содержанием мирамистина до 25 мкг/см³ не снижало интенсивности трансляции.

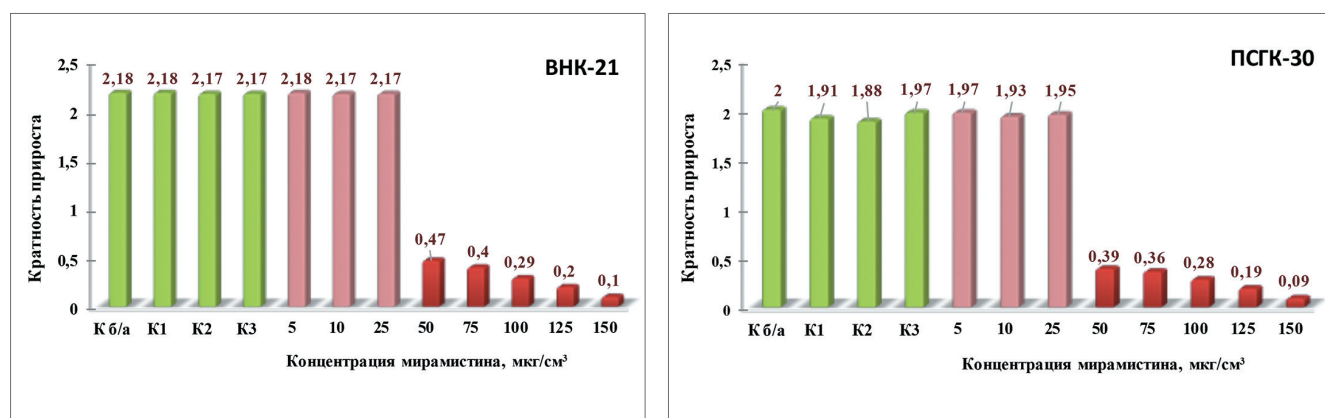


Рис. 2. Оценка кратности прироста клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30, выращенных в среде с разным количеством мирамистина (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³)

К б/а – контроль без антибиотика;
K1 – среда с тетрациклином (5 мкг/см³);
K2 – среда со спирамицином (10 мкг/см³);
K3 – среда с ципрофлоксацином (18 мкг/см³).

Fig. 2. Assessment of proliferation rate of BHK-21 and PSGK-30 cell lines cultivated in the medium with different Miramistin concentrations (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 µg/cm³)

К б/а – control without antibiotics;
K1 – tetracycline-supplemented medium (5 µg/cm³);
K2 – spiramycin-supplemented medium (10 µg/cm³);
K3 – ciprofloxacin-supplemented medium (18 µg/cm³).

По результатам оценки цитотоксического потенциала мирамистина выявлено, что данный антибактериальный препарат не оказывает разрушительного влияния на монослойные клеточные линии ВНК-21 и ПСГК-30 в концентрации до 25 мкг/см³. При этом из литературных источников [2, 3, 6] известно, что представленные концентрации антибиотика входят в диапазон МИК в отношении представителей рода *Mycoplasma*, и, следовательно, мирамистин в указанных количествах позволяет обеспечить профилактику контаминации микоплазмами клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30.

На следующем этапе работы исследовали влияние мирамистина на чувствительность монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 к репродукции вируса ящура на примере штамма А/Забайкальский/2013. Для заражения использовали клетки, выращенные в питательной среде с 25 мкг/см³ мирамистина. В среде для культивирования вируса содержались те же количества антибиотика, которые были добавлены в ростовую среду. Результаты исследования отражены на рисунке 4.

Из представленных на рисунке 4 данных следует, что в результате культивирования вируса ящура штамма А/Забайкальский/2013 в клетках линии ВНК-21, выращенных с добавлением мирамистина, концентрация 146S компонента в суспензии составляла $0,64 \pm 0,05$ мкг/см³. Указанное содержание полных частиц вируса ящура коррелирует с данными для контроля без антибиотика ($0,67 \pm 0,05$ мкг/см³) и для контролей с тетрациклином ($0,62 \pm 0,05$ мкг/см³), спирамицином ($0,63 \pm 0,06$ мкг/см³) и ципрофлоксацином ($0,63 \pm 0,05$ мкг/см³). Следовательно, применение мирамистина в концентрации 25 мкг/см³ не снижает чувствительность монослойной клеточной линии ВНК-21 к заражению и репродукции вируса ящура.

При репродукции вируса ящура штамма А/Забайкальский/2013 в клетках линии ПСГК-30, культивирование которых осуществляли в среде с мирамистином, количество 146S частиц составляло $0,48 \pm 0,05$ мкг/см³. Полученные значения коррелируют с данными для контроля без антибиотика ($0,50 \pm 0,06$ мкг/см³) и для контролей с тетрациклином ($0,46 \pm 0,07$ мкг/см³), спирамицином ($0,48 \pm 0,05$ мкг/см³) и ципрофлоксацином ($0,46 \pm 0,08$ мкг/см³). Таким образом, мирамистин в количестве 25 мкг/см³ не снижает чувствительность монослойной клеточной линии ПСГК-30 к заражению и репродукции вируса ящура.

Результаты проведенных исследований подтверждают, что наличие антибиотика мирамистина в представленных выше предельно допустимых количествах в ростовой и поддерживающей средах не вызывает снижения концентрации 146S компонента вируса ящура по сравнению с другими препаратами против микоплазм и контролем без антибиотиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало возможность использования монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 в качестве тест-систем для оценки базовой цитотоксичности мирамистина.

По результатам оценки цитотоксического потенциала данного антибактериального препарата при анализе морфологического состояния и кратности прироста клеток, а также количества синтезированных клеточных белков выявлено, что мирамистин не оказывал токсического влияния на монослойные клеточные линии ВНК-21 и ПСГК-30 в максимальной дозе 25 мкг/см³. Применение мирамистина в больших концентрациях вызывало появление и нарастание признаков эндогенной интоксикации, что проявлялось в изменении морфологии клеток, появлении грану-

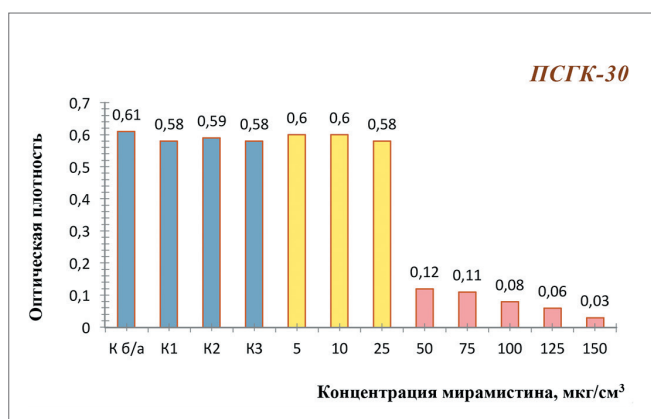
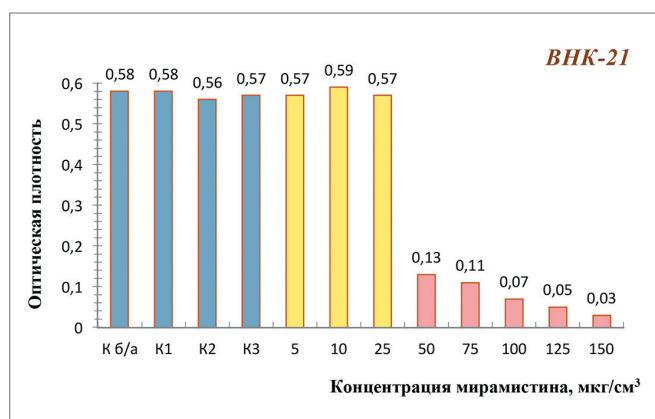


Рис. 3. Гистограммы оценки протеинов клеток линий ВНК-21 и ПСГК-30 через 48 ч культивирования в среде с разным количеством мирамистина (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 мкг/см³)

K 6/a – контроль без антибиотика;

K1 – среда с тетрациклином (5 мкг/см³);

K2 – среда со спирамицином (10 мкг/см³);

K3 – среда с ципрофлоксацином (18 мкг/см³).

Fig. 3. Assessment of BHK-21 and PSGK-30 cell line proteins in 48 hour cultivation in the medium with different miramistin concentrations (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 µg/cm³)

K 6/a – control without antibiotics;

K1 – tetracycline-supplemented medium (5 µg/cm³);

K2 – spiramycin-supplemented medium (10 µg/cm³);

K3 – ciprofloxacin-supplemented medium (18 µg/cm³).

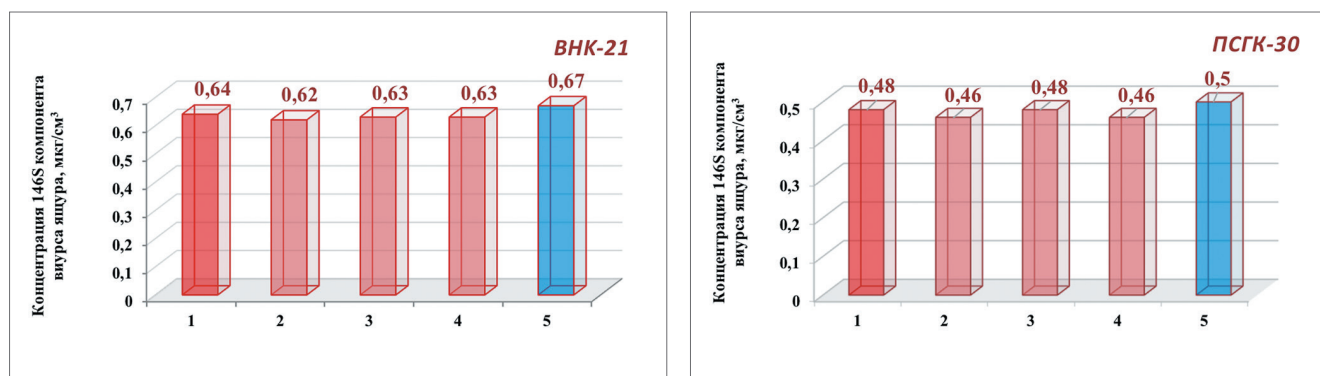


Рис. 4. Концентрация 146S компонента вируса ящура штамма А/Забайкальский/2013 в инактивированных суспензиях после репродукции в клетках линий ВНК-21 и ПСГК-30, культивируемых в среде с мирамистином, в сравнении с контролями

- 1 – среда с мирамистином;
 2 – среда с тетрациклином (5 мкг/см³);
 3 – среда со спирамицином (10 мкг/см³);
 4 – среда с ципрофлоксацином (18 мкг/см³);
 5 – контроль без антибиотика.

Fig. 4. Concentration of 146 S component of FMDV strain A/Zabaikalsky/2013 in inactivated suspensions after reproduction in BHK-21 and PSGK-30 cell lines cultivated in the Miramistin-supplemented compared with the controls

- 1 – Miramistin-supplemented medium;
 2 – tetracycline-supplemented medium (5 µg/cm³);
 3 – spiramycin-supplemented medium (10 µg/cm³);
 4 – ciprofloxacin-supplemented medium (18 µg/cm³);
 5 – control without antibiotics.

лярности и повышении количества лизосом, а также в снижении кратности прироста клеток и синтезированных ими протеинов.

Обнаружено, что наличие 25 мкг/см³ мирамистина в ростовой и поддерживающей среде не вызвало снижения концентрации 146S компонента при репродукции вируса ящура по сравнению с применением других антибиотиков против микоплазм и без них. В результате культивирования штамма А/Забайкальский/2013 вируса ящура в клетках линии ВНК-21, выращенных в среде с 25 мкг/см³ мирамистина, концентрация 146S компонента составляла $0,64 \pm 0,05$ мкг/см³, что на 4,5% ниже по сравнению с контролем без антибиотика, на 3,2; 1,6 и 1,6% выше в сравнении с тетрациклином, спирамицином и ципрофлоксацином. При репродукции вируса ящура в клетках линии ПСГК-30, культивирование которых также осуществляли в среде с 25 мкг/см³ мирамистина, количество 146S частиц составляло $0,48 \pm 0,05$ мкг/см³, что на 4,0% ниже по сравнению с контролем без антибиотика, на 4,3% выше в сравнении с тетрациклином и ципрофлоксацином и равно для среды со спирамицином.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение возможности применения мирамистина для де-контаминации монослойных клеточных линий ВНК-21 и ПСГК-30 от микоплазм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 2, 3 см. REFERENCES)

4. Полянская Г. Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных линиях: автореф. ... д-ра биол. наук. СПб.: 2000. 38 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000255531#?page=1>.
 5. Еропкина М. Ю., Еропкина Е. М. Культура клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб.: МОРПАВ; 2003. 239 с.

6. Дунаевский А. М., Кириченко И. М. Клиническое обследование использования препарата Мирамистин в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы. Обзор литературы. Поликлиника. 2013; 5: 6–12. eLIBRARY ID: 23245010.

7. Романова М. А., Додонова А. Ш. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. Молодой ученый. 2016; 18 (122): 110–114. Режим доступа: <https://moluch.ru/archive/122/33642/>.

8. Zurlo J. Токсикологические анализы *in vitro*. Режим доступа: <http://base.safework.ru/iloenc?print&nd=857400333&spack=110LogLength%3D0%26LogNumDoc%3D857000927%26listid%3D01000000100%26listpos%3D2%26lsz%3D4%26nd%3D857000927%26nh%3D1%26>.

9. Доронин М. И., Шишкова А. А., Ключкина Н. Д., Лозовой Д. А., Михалишин Д. В. Использование ампициллина, ципрофлоксацина, цефотаксима и полимиксина В для профилактики микробной контаминации клеточной линии ВНК-21/2-17. Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2016; 14: 159–176. eLIBRARY ID: 30095811.

10. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. Суздаль; 1994. 92 с.

REFERENCES

1. Fischer O., Hájková M., Hořínová Z., Jurmanová K., Zendulková D. The use of ciprofloxacin for decontamination of LSCC-H 32 cell line of chicken embryonal fibroblasts contaminated by *Mycoplasma arginini*. Acta Vet. Brno. 1992; 61: 51–56. DOI: 10.2754/avb199261010051.
 2. Mycoplasma – The Disaster of Cell Culture. Available at: <https://www.capricorn-scientific.com/lp/mycoexpert-nl/> (date of access: 12.06.2019).
 3. Waites K. B., Taylor-Robinson D. *Mycoplasma and Ureaplasma*. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, F. C. Tenover. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999: 782–794.
 4. Polyanskaya G. G. Patterns of karyotypic variability in cell cultures during prolonged cultivation in different lines [Zakonomenosti kariotipicheskoy izmenchivosti v kletochnykh kul'turakh pri dlitel'nom kul'tivirovanii v raznykh liniyah]: Author's abstract. Dr. Biol. Sciences. SPb.; 2000. 38 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000255531#?page=1>. (in Russian)
 5. Yeropkin M. Yu., Yeropkina Ye. M. Cell culture as a model system for studying toxicity and screening of cytoprotectants [Kul'tura kletok kak model'naya sistema issledovaniya toksichnosti i skringinga citoprotekturnykh preparatov]. Saint Petersburg: MORSAR AV; 2003. 239 p. (in Russian)
 6. Dunayevsky A. M., Kirichenko I. M. Clinical trials of Miramistin use in treatment of infectious and inflammatory respiratory diseases. Literature

review [Klinicheskoe obsledovanie ispol'zovaniya preparata Miramistin v terapii infekcionno-vospalitel'nyh zabolevanij respiratornoj sistemy. Obzor literatury]. *Poliklinika*. 2013; 5: 6–12. eLIBRARY ID: 23245010. (in Russian)

7. Romanova M. A., Dodonova A. Sh. Studying cytotoxicity of biologically active compounds in cell culture [Izuchenie citotoksichnosti biologicheskii aktivnykh soedinenij na kul'ture kletok]. *Young Scientist*. 2016; 18 (122): 110–114. Available at: <https://moluch.ru/archive/122/33642/>. (in Russian)

8. Zurlo J. *In vitro* toxicological analyzes [Toksikologicheskie analizy *in vitro*]. Available at: <http://base.safework.ru/iloenc?print&nd=857400333&spack=110LogLength%3D0%26LogNumDoc%3D857000927%26listid%3D010000000100%26listpos%3D2%26lsz%3D4%26nd%3D857000927%26nh%3D1%26>. (in Russian)

9. Doronin M. I., Shishkova A. A., Klyukina N. D., Lozovoy D. A., Mikhali-shin D. V. Use of ampicillin, ciprofloxacin, cefotaxime and polymyxin B for prevention of BHK-21/2-17 cell line microbial contamination. *Proceedings of the Federal Center for Animal Health*. 2016; 14: 159–176. eLIBRARY ID: 30095811. (in Russian)

10. Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical analysis of virus proteins [Kachestvennyj i kolichestvennyj immunohimicheskij analiz virusnykh belkov]. Suzdal; 1994. 92 p. (in Russian)

Поступила 21.10.19

Принята в печать 16.12.19

Received on 21.10.19

Approved for publication on 16.12.19

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Пронин Валерий Васильевич, доктор биологических наук, профессор, руководитель центра доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Стариков Вячеслав Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Борисов Алексей Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шишкова Анжела Алексеевна, кандидат ветеринарных наук, главный технолог ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Maxim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research and Development, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Valery V. Pronin, Doctor of Science (Biology), Professor, Head of the Centre for Preclinical Studies, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry V. Mikhali-shin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vyacheslav A. Starikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Aleksey V. Borisov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anzhela A. Shishkova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Chief Technologist, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Изучение гуморального иммунитета собак при использовании антирабических инактивированных вакцин, изготовленных с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и GEL 01

А. Н. Балашов¹, М. И. Доронин², А. В. Борисов³, Д. А. Лозовой⁴, Д. В. Михалишин⁵, В. А. Стариков⁶

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0001-7597-6698, e-mail: balashov@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Несмотря на все прилагаемые усилия, проблема бешенства в мире не теряет своей актуальности. Являясь острой природно-очаговой инфекцией, представляет огромную опасность как для животных, так и для человека. Ведущая роль в процессе передачи вируса бешенства человеку принадлежит заболевшим собакам, бешеные животные могут быть потенциальными источниками возбудителя бешенства, что повышает риск передачи смертельно опасного вируса человеку. Профилактика бешенства среди собак во всем мире осуществляется путем учета численности этого вида животных, их обязательной регулярной иммунизации и оценки эффективности вакцинации по уровню накопления антирабических вируснейтрализующих антител. Для формирования защитного уровня гуморального иммунитета у собак против бешенства ($\geq 0,5$ МЕ/см³) применяют инактивированные вакцины, полученные на основе различных штаммов вируса с использованием широкого спектра адъювантов, что позволяет получать вакцины с высокими показателями безопасности и эффективности для целевых видов животных. В статье представлены результаты исследования гуморального иммунитета у 20 беспородных собак на 21 сут после введения антирабических инактивированных вакцин из культурального вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» с применением различных адъювантов. Представленные вакцины против бешенства, изготовленные с использованием масляного адъюванта Montanide ISA 70 VG и гелевого адъюванта Montanide GEL 01, были авирулентными, безвредными и индуцировали напряженный иммунитет у всех привитых животных. Вакцина на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG при однократном введении в дозе 1,0 см³ способствует выработке вируснейтрализующих антирабических антител в 2,4 раза выше по сравнению с препаратом, полученным с использованием адъюванта Montanide GEL 01. Наиболее высокие титры антител против бешенства у собак составляли $48,1 \pm 3,7$ и $28,3 \pm 1,5$ МЕ/см³ и были отмечены при использовании антирабической инактивированной эмульсионной вакцины в дозах 3,0 и 1,0 см³ соответственно.

Ключевые слова: бешенство, инактивированная вакцина против бешенства, гуморальный иммунитет, антирабические вируснейтрализующие антитела, собаки.

Для цитирования: Балашов А. Н., Доронин М. И., Борисов А. В., Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Стариков В. А. Изучение гуморального иммунитета собак при использовании антирабических инактивированных вакцин, изготовленных с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и GEL 01. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 25–30. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-25-30.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

Studies on humoral immunity in dogs after use of rabies inactivated vaccines formulated with Montanide ISA 70 VG and GEL 01 adjuvants

A. N. Balashov¹, M. I. Doronin², A. V. Borisov³, D. A. Lozovoy⁴, D. V. Mikhailishin⁵, V. A. Starikov⁶

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0001-7597-6698, e-mail: balashov@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

SUMMARY

Despite all the efforts made, the issue of rabies in the world does not lose its relevance. As an acute endemic infection, it poses a considerable danger to both animals and humans. The leading role in the transmission of rabies to humans belongs to diseased dogs; stray animals can be potential sources of rabies agent, which increases the risk of transmitting a deadly virus to humans. Rabies prevention in dogs around the world is carried out by counting the number of these animals, their mandatory routine immunization and evaluating the effectiveness of vaccination against the accumulation of rabies virus-neutralizing antibodies. Inactivated vaccines based on different viral strains formulated with a wide range of adjuvants are used to induce a protective level of humoral immunity against rabies in dogs (≥ 0.5 IU/cm³), which allows vaccines with high safety and effectiveness for the target animal species to be obtained. The article presents the results of the study of humoral immunity in 20 non-pedigree dogs 21 days after the administration of rabies inactivated vaccines based on culture rabies virus from ARRIAH strain formulated with various adjuvants. The presented rabies vaccines formulated with oil adjuvant Montanide ISA 70 VG and gel adjuvant Montanide GEL 01 were innocuous and safe and induced strong immunity in all vaccinated animals. The vaccine formulated with Montanide ISA 70 VG adjuvant in case of a single administration in the dose of 1.0 cm³ induces formation of rabies virus-neutralizing antibodies in the level of 2.4 times higher than the vaccine formulated with Montanide GEL 01 adjuvant. The highest levels of rabies antibodies in dogs were 48.1 ± 3.7 and 28.3 ± 1.5 IU/cm³ and were observed with the use of rabies inactivated emulsion vaccine in the doses of 3.0 and 1.0 cm³ respectively.

Key words: rabies, inactivated vaccine against rabies, humoral immunity, rabies virus-neutralizing antibodies, dogs.

For citation: Balashov A. N., Doronin M. I., Borisov A. V., Lozovoy D. A., Mihalishin D. V., Starikov V. A. Studies on humoral immunity in dogs after use of rabies inactivated vaccines formulated with Montanide ISA 70 VG and GEL 01 adjuvants. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 25–30. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-25-30.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство (*Rabies*) занимает первоочередное место в ряде вирусных болезней человека и животных, являясь одним из самых опасных зоонозов, вызывая поражение центральной нервной системы, энцефаломиелиты, параличи с неизбежным летальным исходом. Возбудитель принадлежит порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, виду *Rabies lyssavirus* [1].

Бешенство представляет собой мировую проблему, которой уделяют особое внимание международные организации (ВОЗ, МЭБ, ФАО, GARC) и ветеринарные службы многих стран мира [2, 3]. Заболевание приводит к значительным затратам, которые связаны с гибелью животных, ликвидацией последствий вспышек болезни, проведением профилактических и карантинных мероприятий, регулированием численности диких плотоядных животных, отловом бродячих кошек и собак и осуществлением лабораторных исследований по постановке диагноза [4, 5]. По оценкам специалистов, ежегодный мировой экономический ущерб от бешенства составляет более 8,6 млрд долларов США [6].

Вирус легко распространяется, поэтому данное заболевание может приобретать размах эпизоотий. Большое количество природных очагов бешенства поддерживается преимущественно за счет диких плотоядных животных, однако возбудитель передается и домашним плотоядным животным, что требует повышенного внимания по причине их непосредственной близости к человеку [7]. Считается, что ведущая роль в процессе передачи вируса бешенства человеку принадлежит заболевшим собакам из-за их высокой чувствительности к вирусу, а также ряда свойственных им биологических и экологических особенностей (склонность формировать стаи, способность перемещаться на значительные расстояния и др.). Большинство случаев передачи бешенства от собак человеку связаны с попаданием вирусосодержащей слюны в нанесенные

при укусах раны [4, 8]. В настоящее время более половины населения Российской Федерации содержит дома этих животных. Вместе с тем острой является проблема безнадзорных собак, стаи которых стали обычным явлением в городах и поселках [7, 9]. Именно они могут быть потенциальными источниками возбудителя бешенства, что повышает риск передачи смертельно опасного вируса человеку.

Профилактика бешенства среди собак во всем мире осуществляется путем учета численности этого вида животных, их обязательной регулярной иммунизации и оценки эффективности вакцинации по уровню накопления антирабических вируснейтрализующих антител. Для формирования защитного уровня гуморального иммунитета у собак против бешенства ($\geq 0,5$ ME/cm³) [2] применяют инаktivированные вакцины, полученные на основе различных штаммов вируса бешенства с использованием широкого спектра адъювантов, что позволяет получать вакцины с высокими показателями безопасности и эффективности для целевых видов животных [2, 5, 9, 10, 11].

Целью данной работы было изучение возможности защиты собак от бешенства за счет применения антирабических инаktivированных вакцин, изготовленных на основе штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства с использованием адъювантов Montanide ISA 70 VG и GEL 01.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцины. Экспериментальные серии антирабических инаktivированных вакцин изготавливали из вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ», репродуцированного в суспензионной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (БНК-21). Инаktivацию вируса бешенства проводили с использованием раствора аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ). Очистку суспензии инаktivированного антигена вируса от балластных белков проводили методом простой седиментации. Для

усиления иммунного ответа в состав вакцин включали масляный адъювант Montanide ISA 70 VG, состоящий из минерального масла и неионогенного эмульгатора, и гелевый адъювант Montanide GEL 01, основу которого составляет высокоочищенный мелкодисперсный полиакрилат натрия (SEPPIC, Франция) (табл. 1).

Лабораторные животные. В работе использовали беспородных собак массой 10–15 кг в количестве 30 гол., а также белых мышей массой 10–12 г в количестве 20 особей.

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 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Иммунизация животных. Для проведения исследований всех собак разделили на 6 групп по 5 голов в каждой и вводили им препараты внутримышечно. Антирабической инактивированной сорбированной вакциной иммунизировали: животных первой группы (№ 1–5) однократным введением в цельном виде в дозе 1,0 см³, второй группы (№ 6–10) – в дозе 3,0 см³, третьей группы (№ 11–15) – двукратно по 1,0 см³ с интервалом между инокуляциями в 7 сут. Антирабическую эмульсионную вакцину вводили: собакам четвертой группы (№ 16–20) однократно в дозе 1,0 см³, пятой группы (№ 21–25) – в дозе 3,0 см³, шестой группы (№ 26–30) – двукратно по 1,0 см³ с интервалом между инокуляциями в 7 сут. (табл. 2).

Оценка полноты инактивации антигена вируса бешенства в культуре клеток. Полноту инактивации суспензии инактивированного вируса бешенства контролировали инокуляцией в монослойную перевиваемую клеточную линию ВНК-21 в течение трех последовательных пассажей с применением антирабического иммуноглобулина G, меченного флуоресцеинизотиоцианатом. В качестве положительного контроля использовали лиофильно высушенную суспензию неинактивированного вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» с титром инфекционной активности 7,00 lg КИД₅₀/см³. Отрицательным контролем служила лиофильно высушенная суспензия инактивированного вируса бешенства. Материал считали авирулентным, если ни в одном из трех последовательных пассажей не было обнаружено флуоресцентного свечения, специфичного для вируса бешенства [2].

Оценка безвредности антирабических инактивированных вакцин на белых мышах. Эмульсионную вакцину против бешенства перед введением белым мышам разрушали до выделения антигенной фазы. Для этого препарат подвергали трехкратному замораживанию и оттаиванию с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 7000 g (диаметр ротора – 6 см, скорость – 10 000 об/мин). В результате процесса на дне пробирки осаждался антиген, который использовали для испытания путем интрацеребрального введения по 0,03 см³ десяти белым мышам.

Сорбированную вакцину разбавляли физиологическим раствором в 4 раза, полученную суспензию вводили интрацеребрально по 0,03 см³ десяти мышам [2].

За животными вели наблюдение в течение 21 сут. Вакцину считали безвредным препаратом, если все привитые животные в течение всего срока наблюдения

Таблица 1

Антирабические инактивированные вакцины для собак, изготовленные на основе штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства с применением разных адъювантов

Table 1

Rabies inactivated vaccines for dogs made of ARRIAH strain of rabies virus formulated with different adjuvants

№ п/п	Тип вакцины	Адъювант	Соотношение адъювант/антиген	Тип эмульсии
1	инактивированная сорбированная	Montanide GEL 01	10/90	–
2	инактивированная эмульсионная	Montanide ISA 70	70/30	W/O

W/O – вода/масло (обратная эмульсия).

оставались клинически здоровыми, без проявления признаков, характерных для бешенства [2].

Исследование безвредности вакцины на собаках. Для анализа препаратов на безвредность 10 животным из второй и пятой групп (№ 6–10 – для сорбированной вакцины, № 21–25 – для эмульсионной вакцины) в мышцы шеи вводили вакцины в тройной дозе (по 3,0 см³). Оценивали также безопасность повторного введения в мышцы шеи одинарной дозы данных вакцин с интервалом в 7 сут на 10 собаках третьей и шестой групп (№ 11–15 – для сорбированной вакцины, № 26–30 – для эмульсионного препарата). За клиническим состоянием животных наблюдали на протяжении 14 сут. Вакцину считали безвредной при условии, что все собаки в конце срока наблюдения оставались клинически здоровыми, без формирования некроза в области инокуляции.

Определение количества антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА). Оценку напряженности поствакцинального гуморального антирабического иммунитета у собак на 21 сут после вакцинации проводили при анализе сывороток крови животных № 1–5, 16–30 в реакции нейтрализации (модификация FAVN) с применением монослойной клеточной линии ВНК-21 согласно рекомендациям МЭБ по бешенству [2]. Исследование каждой сыворотки крови проводили в трех повторениях.

Статистическая обработка данных заключалась в определении средних арифметических значений титра антирабических антител и достоверности

Таблица 2

Иммунизация собак антирабическими инактивированными вакцинами на основе штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства и разных адъювантов

Table 2

Immunization of dogs with rabies inactivated vaccines based on ARRIAH strain of rabies virus formulated with different adjuvants

Номер группы	Номер животного	Характеристика вакцины		Прививная доза, см ³
		тип	адъювант	
1	1–5	инактивированная сорбированная	Montanide GEL 01	1,0
2	6–10			3,0
3	11–15			1,0 + 1,0
4	16–20	инактивированная эмульсионная	Montanide ISA 70 VG	1,0
5	21–25			3,0
6	26–30			1,0 + 1,0

Таблица 3

Оценка степени поствакцинального гуморального иммунитета у собак против бешенства в FAVN после введения антирабических инактивированных вакцин с применением разных адъювантов ($n_{\text{исследований}} = 3, p < 0,005$)

Table 3

Evaluation of level of post-vaccination humoral immunity against rabies in dogs by FAVN after administration of rabies inactivated vaccines formulated with different adjuvants ($n_{\text{of tests}} = 3, p < 0.005$)

Номер группы	Характеристика вакцины		Прививная доза, см ³	Номер животного	Титр антирабических ВНА на 21 сут после иммунизации, ME/см ³
	тип	адъювант			
1	инактивированная сорбированная	Montanide GEL 01	1,0	1	13,4 ± 1,2
				2	13,5 ± 0,8
				3	10,3 ± 0,9
				4	10,9 ± 1,5
				5	10,9 ± 1,7
				$M \pm m$	11,8 ± 1,5
4	инактивированная эмульсионная	Montanide ISA 70 VG	1,0	16	29,6 ± 1,7
				17	28,6 ± 1,4
				18	27,4 ± 1,5
				19	29,8 ± 1,5
				20	26,3 ± 1,6
				$M \pm m$	28,3 ± 1,5
5	инактивированная эмульсионная	Montanide ISA 70 VG	3,0	21	43,4 ± 2,8
				22	52,3 ± 3,9
				23	50,8 ± 3,6
				24	48,5 ± 3,7
				25	45,6 ± 3,9
				$M \pm m$	48,1 ± 3,7
6	инактивированная эмульсионная	Montanide ISA 70 VG	1,0+1,0	26	17,5 ± 0,8
				27	15,5 ± 1,5
				28	14,9 ± 1,4
				29	17,2 ± 0,8
				30	16,9 ± 0,8
				$M \pm m$	16,4 ± 1,1

статистической разницы между средними величинами в соответствии с методом Стьюдента-Фишера [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования проводили оценку авирулентности полученного антигена вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» в монослойной клеточной линии ВНК-21. По итогам анализа ни в одном из трех последовательных пассажей специфического для вируса бешенства флуоресцентного свечения детектировано не было, что свидетельствовало о проведении полной инактивации вируса.

На втором этапе работы две предложенные вакцины исследовали на авирулентность на 20 белых мышах и на безвредность с использованием 20 собак (№ 6–15, 21–30). По результатам анализа изготовленные препараты были признаны авирулентными и безвредными, поскольку все иммунизированные животные в течение всего срока

наблюдения оставались клинически здоровыми, без проявления признаков бешенства и без формирования некроза тканей на месте введения препарата.

Следующий этап исследования был посвящен изучению поствакцинального гуморального иммунитета у 20 собак после введения антирабических вакцин, изготовленных на основе штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и Montanide GEL 01. Иммунизацию животных четырех групп проводили в соответствии со схемой, представленной в таблице 2. До вакцинации и спустя 21 сут после введения препаратов у собак отобрали кровь и исследовали сыворотки в реакции нейтрализации (модификация FAVN) [2]. Выявили, что до иммунизации сыворотки крови животных не содержали антител против вируса бешенства.

Из данных таблицы 3 и рисунков 1–4 видно, что у животных первой группы, привитых антирабической инактивированной сорбированной вакциной с применением адъюванта Montanide GEL 01 однократно в дозе 1,0 см³, титры ВНА в среднем составляли 11,8 ± 1,5 ME/см³. Данное значение в 2,4 раза ниже, чем у собак из четвертой группы, иммунизированных однократно в дозе 1,0 см³ вакциной с применением адъюванта Montanide ISA 70 VG, у которых титры антител против вируса бешенства составили 28,3 ± 1,5 ME/см³. Учитывая, что уровень гуморального иммунитета у собак, вакцинированных эмульсионной вакциной, выше по сравнению с сорбированным препаратом, дальнейшие исследования проводили с вакциной, изготовленной на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG, увеличив дозу в три раза, а также вакцинируя дважды в дозе 1,0 см³ с интервалом 7 сут. Так, у животных пятой группы, которым инокулировали эмульсионную вакцину однократно в дозе 3,0 см³, титры ВНА соответствовали значениям 48,1 ± 3,7 ME/см³, что в 4,1 и 2,4 раза выше, чем у животных первой и четвертой групп соответственно. У собак шестой группы, привитых данным препаратом двукратно по 1,0 см³, титры ВНА в среднем составляли 16,4 ± 1,1 ME/см³, что в 1,4 раза выше, чем у животных первой группы.

В результате проведенного сравнительного анализа полученных данных установлено, что антирабическая инактивированная эмульсионная вакцина, изготовленная с применением адъюванта Montanide ISA 70 VG, стимулировала формирование более напряженного гуморального иммунитета по сравнению с сорбированной вакциной, полученной с использованием адъюванта Montanide GEL 01. Так, в группе животных, которых иммунизировали эмульсионной вакциной однократно в дозе 1,0 см³, титр ВНА был в 1,7 раза выше по сравнению с данными для сорбированного вакцинного препарата. Уровень антирабических антител у собак, иммунизированных эмульсионной вакциной однократно в дозе 3,0 см³ и двукратно по 1,0 см³, был соответственно в 4,1 и 1,4 раза выше, чем у животных, привитых сорбированной вакциной.

Сравнивая средние значения титров антирабических антител у собак на 21 сут после иммунизации эмульсионной вакциной в разных дозах, выявили, что наиболее высокий уровень ВНА достигался при однократной инокуляции препаратом в дозе 3,0 см³ (48,1 ± 3,7 ME/см³).

Введение в организм собак данной антирабической вакцины однократно в дозе 1,0 см³ и двукратно по 1,0 см³ на 21 сут после иммунизации стимулировало накопле-

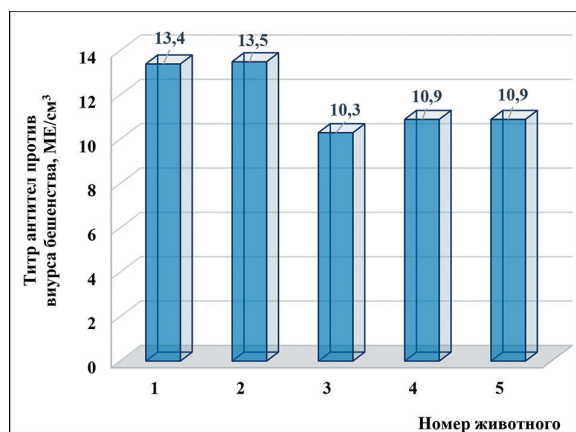


Рис. 1. Гуморальный иммунитет у собак на 21 сут после однократного введения антирабической инактивированной сорбированной вакцины на основе адъюванта Montanide GEL 01 в дозе 1,0 см³ (по данным FAVN)

Fig. 1. Humoral immunity in dogs 21 days after single administration of anti-rabies inactivated adsorbed vaccine based on Montanide GEL 01 adjuvant at a dose of 1.0 cm³ (according to the FAVN data)

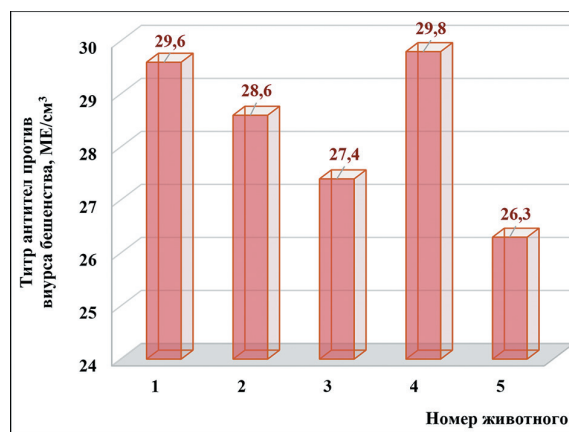


Рис. 2. Гуморальный иммунитет у собак на 21 сут после однократного введения антирабической инактивированной эмульсионной вакцины на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG в дозе 1,0 см³ (по данным FAVN)

Fig. 2. Humoral immunity in dogs 21 days after single administration of anti-rabies inactivated emulsion vaccine based on Montanide ISA 70 VG adjuvant at a dose of 1.0 cm³ (according to the FAVN data)

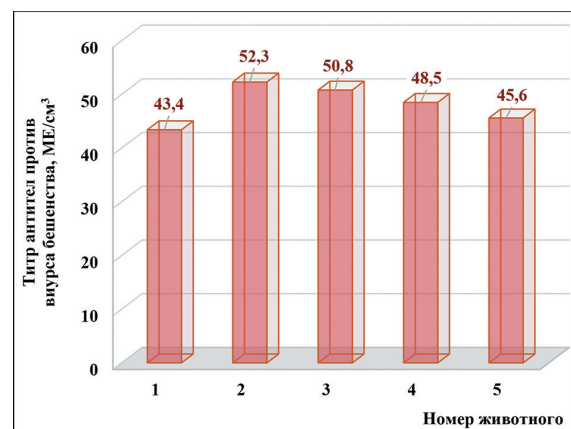


Рис. 3. Гуморальный иммунитет у собак на 21 сут после однократного введения антирабической инактивированной эмульсионной вакцины на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG в дозе 3,0 см³ (по данным FAVN)

Fig. 3. Humoral immunity in dogs 21 days after single administration of anti-rabies inactivated emulsion vaccine based on Montanide ISA 70 VG adjuvant at a dose of 3.0 cm³ (according to the FAVN data)

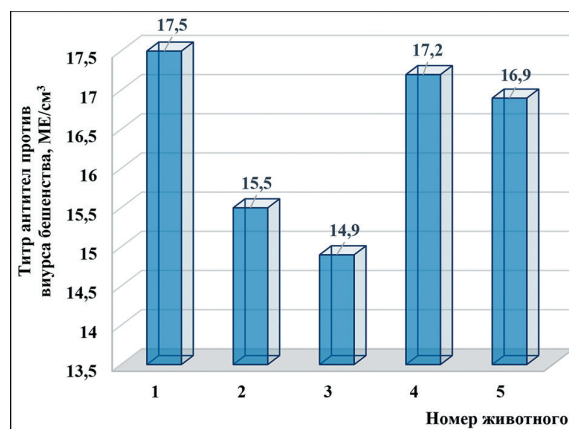


Рис. 4. Гуморальный иммунитет у собак на 21 сут после двукратного введения антирабической инактивированной эмульсионной вакцины с применением адъюванта Montanide ISA 70 VG по 1,0 см³ с интервалом 7 сут (по данным FAVN)

Fig. 4. Humoral immunity in dogs 21 days after double administration of anti-rabies inactivated emulsion vaccine based on Montanide ISA 70 VG adjuvant at a dose of 1.0 cm³ at 7-day interval (according to the FAVN data)

ние ВНА в титрах $28,3 \pm 1,5$ и $16,4 \pm 1,1$ МЕ/см³, что в 2,4 и 2,9 раза ниже по сравнению с однократным введением указанного препарата в дозе 3,0 см³. Следует отметить, что на протяжении всего срока наблюдения (21 сут) состояние всех животных, привитых представленными вакцинами в разных дозах, было удовлетворительным.

В результате проведенных исследований выявили, что разработанные антирабические инактивированные вакцины из штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и Montanide GEL 01 на 21 сут после введения индуцировали у собак выработку защитного уровня антител (выше 0,5 МЕ/см³) и тем самым соответствовали требованиям МЭБ по иммуногенности [2]. При этом наиболее высокие показатели уровня гуморального иммунитета

у собак против бешенства $48,1 \pm 3,7$ и $28,3 \pm 1,5$ МЕ/см³ отмечали при использовании антирабической инактивированной эмульсионной вакцины в дозах 3,0 и 1,0 см³ соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование иммунобиологических свойств двух антирабических инактивированных вакцин из штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и Montanide GEL 01.

При тестировании на белых мышах и собаках установили, что полученные препараты являются безвредными.

Проведена оценка гуморального иммунитета у 20 беспородных собак на 21 сут после введения

разработанных вакцин в разных дозах. Выявили, что разработанные антирабические инактивированные вакцины стимулировали у собак формирование защитного уровня антител и соответствовали требованиям МЭБ по иммуногенности.

Обнаружено, что наиболее высокие показатели уровня гуморального иммунитета у собак против бешенства на 21 сут составили $48,1 \pm 3,7$ и $28,3 \pm 1,5$ МЕ/см³ и отмечались при использовании антирабической инактивированной эмульсионной вакцины в дозах 3,0 и 1,0 см³ соответственно. Вакцина с применением масляного адъюванта Montanide ISA 70 VG при однократном введении в дозе 1,0 см³ способствовала выработке вируснейтрализующих антирабических антител в 2,4 раза выше по сравнению с препаратом, полученным с использованием адъюванта Montanide GEL 01.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 2, 3, 5, 6 см. REFERENCES)

1. Метлин А. Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов. *Ветеринария сегодня*. 2017; 3 (22): 52–57. eLIBRARY ID: 30079581.
4. Груздев Л. К., Уласов В. И., Груздев К. Н. Экология вируса бешенства и проблемы контроля заболевания. *Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных: материалы Международной научно-практической конференции*. Троицк: УГАВМ; 2000: 155.
7. Березина Е. С. Экология собак городских популяций. Классификация экологических групп, численность, популяционная структура, коммуникации (на модели г. Омска и области). *Ветеринарная патология*. 2002; 1: 132–135. eLIBRARY ID: 9129939.
8. Груздев К. Н., Метлин А. Е. Бешенство животных. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 394 с.
9. Борисов А. В. Разработка технологии изготовления вирусвакцин против бешенства диких плотоядных: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Владимир; 2003. 23 с.
10. Чернышова Е. В., Назаров Н. А., Метлин А. Е., Рыбаков С. С., Чепуркин А. В., Сухарьков А. Ю., Еремина А. Г., Иовлева А. Ю. Анализ иммуногенности вакцин, применяемых для профилактики бешенства животных на территории Российской Федерации. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2010; 8: 64–73. eLIBRARY ID: 15595682.
11. Чупин С. А., Доронин М. И., Чернышова Е. В., Шульпин М. И. Генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской области. *Ветеринария сегодня*. 2015; 4 (15): 46–48. eLIBRARY ID: 25596872.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. д-ра физ.-мат. наук Ю. А. Данилова; под ред. Н. Е. Бузикашвили, Д. В. Самойлова. М.: Практика; 1999. 459 с. Режим доступа: <https://medstatistic.ru/articles/glantz.pdf>.

REFERENCES

1. Metlin A. Ye. Modern aspects of Lyssavirus classification. *Veterinary Science Today*. 2017; 3: 52–57. eLIBRARY ID: 30079581. (in Russian)
2. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris; 2018; Chap. 3.1.17: 578–612. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf.
3. WHO Publication. Rabies vaccines: WHO position paper-recommendations. *Vaccine*. 2010; 28(44): 7140–7142. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.08.082.
4. Gruzdev L. K., Ulasov V. I., Gruzdev K. N. Ecology of rabies virus and disease control problems [Ekologiya virusa beshenstva i problemy kontrolya zabolevaniya]. *Current problems of biology and veterinary medicine of small domestic animals: materials of the International Scientific and Practical Conference*. Troitsk: UGAVM; 2000: 155. (in Russian)
5. Barrat J., Picard-Meyer E., Cliquet F. Rabies diagnosis. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006; 125: 71–77. PMID: 16878462.
6. Hampson K., Coudelive L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Attlan M., Barrat J., Blanton J. D., Briggs D. J., Cleaveland S., Costa P., Freuling C. M., Hiby E., Knopf L., Leanes F., Meslin F. X., Metlin A., Miranda M. E., Müller T., Nel L. H., Recuenco S., Rupprecht C. E., Schumacher C., Taylor L., Vigilato M. A., Zinsstag J., Dushoff J. Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies Prevention. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4): e0003709. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003709.
7. Berezina E. S. Ecology of dogs in urban populations. Classification of ecological groups, numbers, population structure, communications (on the model of Omsk and Omsk region) [Ekologiya sobak gorodskih populyacij. Klassifikatsiya ekologicheskikh grupp, chislennost', populyacionnaya struktura, kommunikatsii (na modeli g. Omska i oblasti)]. *Veterinarnaya patologiya*. 2002; 1: 132–135. eLIBRARY ID: 9129939. (in Russian)
8. Gruzdev K. N., Metlin A. Ye. Animal Rabies. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2019. 394 p. (in Russian)
9. Borisov A. V. Development of manufacturing technology for virus vaccines against rabies in wild carnivores [Razrabotka tekhnologii izgotovleniya virusvakcin protiv beshenstva dikh plotoyadnykh]: author. dis. ... cand. of vet. science. Vladimir; 2003. 23 p. (in Russian)
10. Chernyshova Ye. V., Nazarov N. A., Metlyn A. Ye., Rybakov S. S., Chepurkin A. V., Sukharkov A. Yu., Yeryomina A. G., Iovleva A. Yu. Potency testing of vaccines used for rabies prevention in the territory of the Russian Federation. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2010; 8: 64–73. eLIBRARY ID: 15595682. (in Russian)
11. Chupin S. A., Doronin M. L., Chernyshova Ye. V., Shulpin M. I. Genetic characterization of rabies virus isolates detected in the territory of the Vladimir Oblast. *Veterinary Science Today*. 2015; 4 (15): 46–48. eLIBRARY ID: 25596872. (in Russian)
12. Glantz S. Primer of Biostatistics. Transl. from English by Yu. A. Danilov, Dr. Phys.-Math. Sciences; ed. by N. Ye. Buzikashvili, D. V. Samoilova. M.: Praktika; 1999. 459 p. Available at: <https://medstatistic.ru/articles/glantz.pdf>. (in Russian)

Поступила 20.11.19

Принята в печать 16.01.20

Received on 20.11.19

Approved for publication on 16.01.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Балашов Андрей Николаевич, ведущий технолог лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Борисов Алексей Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Стариков Вячеслав Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Andrey N. Balashov, Leading Technologist, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Aleksey V. Borisov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research and Development, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry V. Mikhailishin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vyacheslav A. Starikov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных

А. В. Шишков¹, Д. А. Лозовой², А. В. Борисов³, Д. В. Михалишин⁴

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-9777-1404, e-mail: shishkov@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Бешенство имеет первоочередное значение в ряду вирусных болезней человека и животных, являясь одним из самых опасных зоонозов, вызывая поражение центральной нервной системы с неизбежным летальным исходом. Заболевание представляет собой мировую проблему, которой уделяют особое внимание международные организации (ВОЗ, МЭБ, FAO, GARC) и ветеринарные службы многих стран мира. Для специфической профилактики бешенства среди диких плотоядных животных применяют разнообразные антирабические вакцины, однако существуют сомнения в безопасности и эффективности некоторых из них. Ведутся разработки новых, более совершенных препаратов, одним из которых является антирабическая живая оральная вакцина «Ферарабивак». Проведены исследования по изучению ее иммуногенных и протективных свойств для диких плотоядных животных. Оптимальная иммунизирующая доза препарата составляет 2,0 см³ с титром инфекционной активности вируса бешенства штамма РВ-97 не менее 6,00 lg ККИД₅₀/см³. Через 14 сут после оральной иммунизации данной вакциной антирабические антитела обнаружены в сыворотке крови лисиц и енотовидных собак в титрах 0,70 ± 0,18 и 0,73 ± 0,19 МЕ/см³ соответственно, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства (≥ 0,50 МЕ/см³). Спустя 50 сут уровень антирабических вируснейтрализующих антител у лисиц достигал максимальных значений и составлял 4,30 ± 0,32 МЕ/см³. Титр антител у вакцинированных енотовидных собак достигал максимальных значений также спустя 50 сут и был равен 4,53 ± 0,27 МЕ/см³. Минимальный пороговый уровень вируснейтрализующих антител определяли через 12 месяцев после иммунизации, он составлял у лисиц и енотовидных собак 0,62 ± 0,28 и 0,71 ± 0,17 МЕ/см³ соответственно, что доказывает необходимость проведения повторной вакцинации животных против бешенства через год. В результате контрольного заражения через 30 сут после вакцинации все животные, иммунизированные антирабической живой вакциной «Ферарабивак», в течение всего срока наблюдения не проявляли клинических признаков бешенства.

Ключевые слова: бешенство диких плотоядных животных, антирабическая живая оральная вакцина «Ферарабивак», антирабические вируснейтрализующие антитела.

Для цитирования: Шишков А. В., Лозовой Д. А., Борисов А. В., Михалишин Д. В. Исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 31–37. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-31-37.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Шишков Александр Валерьевич, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: shishkov@arriah.ru.

Testing of Ferarabivac anti-rabies live vaccine for wild carnivores for its immunogenicity and protectivity

A. V. Shishkov¹, D. A. Lozovoy², A. V. Borisov³, D. V. Mihalishin⁴

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-9777-1404, e-mail: shishkov@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

SUMMARY

Rabies is one of the most important human and animal viral diseases, being one of the most dangerous zoonoses, causing damage to the central nervous system with an inevitable fatal outcome. This disease is of global concern, and it attracts special attention of international organizations (WHO, OIE, FAO, GARC) and of veterinary services in many countries around the world. A variety of anti-rabies vaccines have been used for specific rabies prevention in wild carnivores, however, the safety and effectiveness of some of them is doubtful. New, more advanced products are being developed, one of which is Ferarabivac, a live oral vaccine. The vaccine was tested for

its immunogenicity and protectivity in wild carnivores. The optimal immunizing dose was 2.0 cm³, with the infectivity titre of RV-97 strain of at least 6.00 lg KID₅₀/cm³. Anti-rabies antibody titres detected in the blood sera of foxes and raccoon dogs 14 days post vaccination, were 0.70 ± 0.18 and 0.73 ± 0.19 IU/cm³, respectively, which provided protection against rabies virus infection (≥ 0.50 IU/cm³). Rabies virus neutralizing antibodies in foxes reached their maximum level of 4.30 ± 0.32 IU/cm³ 50 days post vaccination. Antibody titres in vaccinated raccoon dogs also reached their maximum level of 4.53 ± 0.27 IU/cm³ 50 days post vaccination. The minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies was determined 12 months after the vaccination, and it was 0.62 ± 0.28 and 0.71 ± 0.17 IU/cm³ in foxes and raccoon dogs, respectively, which proves the necessity to perform booster vaccination one year later. No animals vaccinated against rabies with Ferarabivac live vaccine showed any clinical signs of the disease during the entire observation period following the challenge test carried out 30 days post vaccination.

Keywords: rabies of wild carnivorous animals, Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine, rabies virus neutralizing antibodies.

For citation: Shishkov A. V., Lozovoy D. A., Borisov A. V., Mikhailishin D. V. Testing of Ferarabivac anti-rabies live vaccine for wild carnivores for its immunogenicity and protectivity. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 31–37. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-31-37.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Alexander V. Shishkov, Leading Veterinarian of the Laboratory for FMD Prevention FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: shishkov@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель бешенства, по данным Международного комитета по таксономии вирусов, относится к роду *Lyssavirus*, семейству *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales* [1]. Род *Lyssavirus* включает классический вирус бешенства (RABV), который относится к филогенетической группе 1 и распространен среди различных видов животных по всему миру [1, 2].

Бешенство занимает важное место в ряду вирусных болезней человека и животных, являясь одним из высокоопасных зоонозов, вызывая поражение центральной нервной системы, энцефаломиелиты, параличи с неизбежным летальным исходом [3, 4]. В связи с этим рабическая болезнь представляет мировую проблему в сфере инфекционной патологии, эпидемиологии, эпизоотологии и экологии [5].

В настоящее время в развитых странах, в том числе в России, где технологии изготовления вакцин отвечают современным требованиям, отказались от производства тканевых антирабических препаратов и изготавливают живые и инактивированные культуральные вакцины против бешенства для парентерального и орального применения [4].

В мире существуют разнообразные антирабические вакцины для оральной иммунизации диких плотоядных животных, однако возникают сомнения в безопасности и эффективности некоторых из них. В настоящее время ведутся разработки новых, более совершенных по данным показателям препаратов [4, 6, 7]. Эксперты и специалисты ВОЗ, МЭБ, FAO, GARC постоянно указывают на необходимость совершенствования имеющихся антирабических препаратов и разработку новых, более безопасных вакцин [4].

Противозооотические мероприятия, осуществляемые на территории Российской Федерации в последнее время, не позволяют значительно ограничить распространение бешенства среди животных [2]. В России применяются отечественные оральные антирабические вакцины для диких плотоядных животных, изготовленные с применением аттенуированного штамма вируса бешенства, позволяющего защищать от любого варианта возбудителя бешенства филогенетической группы 1 [8, 9, 10].

Эффективность профилактической вакцинации зависит от способа применения, качества выпускаемых вакцин и числа иммунизированных диких плотоядных

животных [2, 10]. Для каждого вида целевых животных эффективность вакцины должна быть доказана посредством статистически достоверного исследования при иммунизации пероральной вакциной с последующим контрольным заражением животных и оценкой протективных свойств вакцинного препарата. В опытах используют наиболее восприимчивых, молодых особей, для которых рекомендована вакцина. Значения титров антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) должны подтверждать эффективность вакцинного препарата для каждого вида целевых животных. Для этого проводят изучение выработки защитных антител в реакции нейтрализации (модификация RFFIT) [8] и продолжительности иммунитета у диких плотоядных животных [6, 7].

Производство антирабических вакцин для животных регламентировано требованиями Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), в соответствии с которыми вакцина должна обеспечивать надежный иммунитет у целевых видов животных (индекс иммуногенности ≥ 1,0) и индуцировать выработку ВНА в титре не менее 0,5 МЕ/см³ [4].

Цель данной работы заключалась в исследовании иммуногенных и протективных свойств антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» для диких плотоядных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус бешенства. Для изготовления антирабической вакцины «Ферарабивак» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») использовали живой аттенуированный штамм RV-97 вируса бешенства, который депонирован в Коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Для контрольного заражения применяли штамм стандарта контрольного вируса бешенства CVS-27.

Вакцина. В работе использовали антирабическую живую вакцину «Ферарабивак» орального применения для диких плотоядных животных, которая содержала суспензию аттенуированного вируса бешенства штамма RV-97 с титром инфекционной активности не ниже 6,0 lg KID₅₀/см³ в дозах 1,0; 2,0 и 5,0 см³.

Животные. Для исследования иммуногенных свойств вакцины использовали лисиц рыжих в возрасте 9–12 месяцев в количестве 115 голов; енотовидных собак в возрасте 9–12 месяцев в количестве 85 голов. Животных закупали в звероводческих хозяйствах

Московской области. Все опытные животные, по данным исследования в реакции нейтрализации, не имели ВНА к вирусу бешенства.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33215-2014, принятым Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2012 по охране животных, используемых в научных целях.

Определение титра инфекционной активности вируса бешенства. Инфекционную активность вируса бешенства определяли с применением монослойной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17) с последующим окрашиванием антирабическим иммуноглобулином G, меченным флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) [11]. Значения титра вируса бешенства вычисляли с использованием метода Спирмана-Кербера [12] и выражали в Ig ККИД₅₀/см³.

Отбор проб головного мозга и крови. При отборе проб головного мозга и крови диких плотоядных животных руководствовались «Методическими указаниями по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин», разработанными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [13].

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Отпечатки тканей головного мозга от целевых животных исследовали в прямом варианте РИФ, сущность которого заключается в соединении антирабических антител, меченных ФИТЦ, со специфическим антигеном и наблюдении светящихся комплексов «антитело-антиген» в полях зрения люминесцентного микроскопа [14].

Исследование иммуногенных свойств вакцины. Длительность сформированного иммунитета у целевых животных в конце заявленного периода защиты оценивали при анализе сывороток крови целевых животных в реакции нейтрализации (модификация FAVN) с применением монослойной клеточной линии ВНК-21/2-17 и ФИТЦ-иммуноглобулина согласно рекомендациям МЭБ по бешенству [4]. Использовали антирабический лиофилизированный сывороточный стандарт МЭБ с активностью 6,7 МЕ/см³, приготовленный из сывороток крови иммунизированных собак, и отрицательный сывороточный стандарт МЭБ, приготовленный из сывороток крови неиммунизированных собак (ANSES, Nancy, France). Исследование каждой сыворотки крови проводили в трех повторениях.

Исследование протективных свойств вакцины. При исследовании эффективности иммунизации использовали по 25 вакцинированных и по 10 контрольных голов целевых видов животных. Контрольное заражение проводили на 30 сут после вакцинации в дозе 25 000 LD₅₀/см³. После заражения за животными наблюдали ежедневно в течение 90 сут. Как только у животных начинали проявляться клинические признаки бешенства, их подвергали эвтаназии и посредством использования РИФ подтверждали наличие вируса бешенства. В конце периода наблюдения всех выживших животных усыпляли и с использованием РИФ проводили исследования отпечатков головного мозга.

Статистическая обработка данных. Полученные данные статистически обрабатывали, вычисляя сред-

ние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера [12]. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антирабическая живая оральная вакцина «Ферарабивак» предназначена для профилактики бешенства у диких плотоядных животных, и единственным способом иммунизации в данном случае является поедание препарата.

На первом этапе работы проводили исследование по определению иммунизирующей дозы антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» на 30 рыжих лисицах. Животные были разделены на 3 группы по 10 голов в каждой. Первой группе животных скормили по 1 приманке, содержащей 1,0 см³ вакцины, второй группе – по 1 приманке, содержащей 2,0 см³ вакцины, третьей группе – по 1 приманке, содержащей 5,0 см³ вакцины. На 14, 21, 30 и 60 сут после вакцинации у животных отбирали кровь, полученные сыворотки исследовали на наличие антирабических ВНА. Результаты представлены в таблице 1.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что при поедании лисицами приманки, содержащей 1,0 см³ вакцины, титры антирабических ВНА на 14, 21, 30, 60 сут после вакцинации составляли $0,30 \pm 0,29$; $0,90 \pm 0,25$; $1,25 \pm 0,25$; $2,00 \pm 0,21$ МЕ/см³ соответственно. В результате поедания данного вакцинного препарата в дозе 2,0 см³ количество ВНА против вируса бешенства на 14, 21, 30, 60 сут после иммунизации составляло $0,69 \pm 0,18$; $2,20 \pm 0,23$; $3,20 \pm 0,34$; $4,20 \pm 0,38$ МЕ/см³ соответственно. При поедании препарата в дозе 5,0 см³ титры антирабических ВНА на 14, 21, 30, 60 сут после вакцинации были равны $0,78 \pm 0,25$; $2,60 \pm 0,35$; $4,00 \pm 0,28$; $4,96 \pm 0,30$ МЕ/см³ соответственно. Исходя из полученных данных, учитывая требования МЭБ и с точки зрения экономической целесообразности, эффективной иммунизирующей дозой рассматриваемой вакцины для лисиц является 2,0 см³ с титром инфекционной активности не менее 6,00 Ig ККИД₅₀/см³, которая обеспечивает защиту животного от заражения бешенством через 14 сут после иммунизации. При скормлении животным приманки с 5,0 см³ вакцины

Таблица 1

Определение иммунизирующей дозы антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных ($n = 10$, $p < 0,05$)

Table 1

Determination of immunizing dose of Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine for wild carnivores ($n = 10$, $p < 0.05$)

Сутки после вакцинации	Титр антирабических ВНА (МЕ/см ³)* при поедании вакцины в разных дозах		
	1,0 см ³	2,0 см ³	5,0 см ³
14	$0,30 \pm 0,29$	$0,69 \pm 0,18$	$0,78 \pm 0,25$
21	$0,90 \pm 0,25$	$2,20 \pm 0,23$	$2,60 \pm 0,35$
30	$1,25 \pm 0,25$	$3,20 \pm 0,34$	$4,00 \pm 0,28$
60	$2,00 \pm 0,21$	$4,20 \pm 0,38$	$4,96 \pm 0,30$

* По данным реакции нейтрализации (модификация FAVN).

Таблица 2
Оценка иммуногенной активности антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» на лисицах и енотовидных собаках ($n = 25, p < 0,05$)

Table 2
Assessment of the immunogenicity of Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine in foxes and raccoon dogs ($n = 25, p < 0.05$)

Сутки после вакцинации	Титры антирабических ВНА, МЕ/см ³ *	
	лисицы	енотовидные собаки
14	$0,70 \pm 0,18$	$0,73 \pm 0,19$
30	$3,20 \pm 0,22$	$3,50 \pm 0,22$
50	$4,30 \pm 0,32$	$4,53 \pm 0,27$
60	$4,20 \pm 0,40$	$4,30 \pm 0,30$
70	$4,00 \pm 0,29$	$4,09 \pm 0,32$
80	$3,81 \pm 0,42$	$3,90 \pm 0,23$
90	$3,70 \pm 0,35$	$3,80 \pm 0,41$

* По данным реакции нейтрализации (модификация FAVN).

формировалось сопоставимое количество ВНА против вируса бешенства, но со значительным расходом вакцинного сырья. Использование иммунизирующей дозы в объеме 1,0 см³ на 14 сут после вакцинации вызывало накопление антирабических ВНА, но недостаточное для защиты животных от бешенства ($< 0,50$ МЕ/см³).

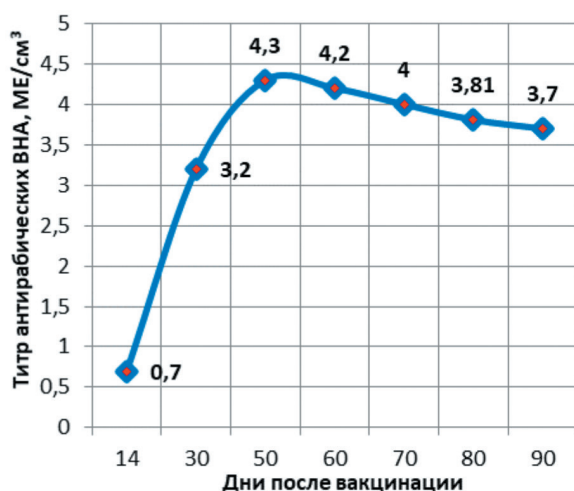
На следующем этапе исследования был проведен опыт по изучению иммуногенной активности вакцины «Ферарабивак» на 25 лисицах и 25 енотовидных собаках. Животным перорально было введено по одной дозе вакцины, содержащей 2,0 см³ аттенуированного вируса бешенства с титром 6,0 Ig ККИД₅₀/см³. Спустя 14, 30, 50, 60, 70, 80 и 90 сут после вакцинации у животных отбирали кровь и определяли титр вирусспецифических антител в сыворотках. Результаты исследований представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что антирабическая живая оральная вакцина

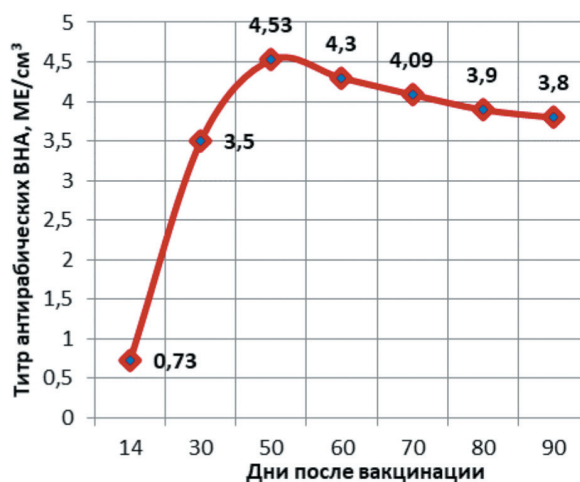
«Ферарабивак» индуцировала у животных выработку ВНА против вируса бешенства. Так, через 14 сут после оральной иммунизации антирабические антитела обнаружены в сыворотке крови лисиц и енотовидных собак в титрах $0,70 \pm 0,18$ и $0,73 \pm 0,19$ МЕ/см³ соответственно, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства ($\geq 0,50$ МЕ/см³), а через 30 сут – $3,20 \pm 0,22$ и $3,50 \pm 0,22$ МЕ/см³ соответственно. Спустя 50 сут уровень антирабических ВНА у лисиц достигал максимальных значений и составлял $4,30 \pm 0,32$ МЕ/см³. Далее наблюдалось снижение титра ВНА, но при этом через 90 сут он оставался на высоком уровне и составлял $3,70 \pm 0,35$ МЕ/см³, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства ($\geq 0,50$ МЕ/см³). Уровень титров ВНА у енотовидных собак, вакцинированных препаратом «Ферарабивак», достигал максимальных значений спустя 50 сут и был равен $4,53 \pm 0,27$ МЕ/см³, а затем постепенно снижался и через 90 сут после иммунизации составлял $3,80 \pm 0,41$ МЕ/см³.

Для оценки протективных свойств антирабической живой вакцины «Ферарабивак» орального применения для диких плотоядных животных использовали 35 лисиц, которых разделили на две группы: опытную (№ 1) – 25 голов и контрольную (№ 2) – 10 голов, а также 35 енотовидных собак, которые также были разделены на опытную (№ 3) – 25 голов и контрольную (№ 4) группы – 10 голов. Животных групп № 1 и 3 иммунизировали вакциной в дозе 2,0 см³. В группах № 2 и 4 находились контрольные животные, которых не подвергали иммунизации. Перед заражением у животных отбирали кровь для определения титра антирабических ВНА. Через 30 сут после поедания препарата проводили контрольное заражение лабораторных животных контрольным штаммом CVS-27 вируса бешенства в дозе 25 000 LD₅₀/см³. В течение 90 сут проводили ежедневную оценку клинического состояния животных. Результаты опыта представлены в таблицах 3 и 4.

В результате контрольного заражения все животные, иммунизированные антирабической живой вакциной «Ферарабивак», не проявляли клинических признаков бешенства. Средние значения титров антител против



А



Б

Рис. 1. Иммуногенная активность антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» при исследовании на лисицах (А) и енотовидных собаках (Б)

Fig. 1. Immunogenicity of Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine in foxes (A) and raccoon dogs (B)

Таблица 3

Результаты заражения контрольным штаммом вируса бешенства CVS-27 лисиц через месяц после иммунизации вакциной «Ферарабивак» ($n_{\text{иссл.}} = 3, p < 0,05$)

Table 3

Challenge of foxes with CVS 27 strain one month post vaccination with Ferarabivac ($n = 3, p < 0,05$)

Номер группы	Номер животного	Титр антирабических ВНА в реакции нейтрализации, МЕ/см ³	Результаты контрольного заражения	
			наличие/отсутствие клинических признаков бешенства	исследование головного мозга в РИФ
1 (опытная)	1	3,20 ± 0,21	—	отрицат.
	2	3,32 ± 0,20	—	отрицат.
	3	3,18 ± 0,24	—	отрицат.
	4	3,25 ± 0,19	—	отрицат.
	5	3,31 ± 0,20	—	отрицат.
	6	3,24 ± 0,21	—	отрицат.
	7	3,42 ± 0,25	—	отрицат.
	8	3,14 ± 0,18	—	отрицат.
	9	3,24 ± 0,27	—	отрицат.
	10	3,20 ± 0,25	—	отрицат.
	11	3,28 ± 0,21	—	отрицат.
	12	3,15 ± 0,24	—	отрицат.
	13	3,25 ± 0,21	—	отрицат.
	14	3,38 ± 0,25	—	отрицат.
	15	3,39 ± 0,20	—	отрицат.
	16	3,18 ± 0,24	—	отрицат.
	17	3,05 ± 0,19	—	отрицат.
	18	3,38 ± 0,20	—	отрицат.
	19	3,08 ± 0,21	—	отрицат.
	20	3,42 ± 0,27	—	отрицат.
	21	3,40 ± 0,19	—	отрицат.
	22	3,24 ± 0,27	—	отрицат.
	23	3,20 ± 0,27	—	отрицат.
	24	3,36 ± 0,21	—	отрицат.
	25	3,19 ± 0,24	—	отрицат.
	$M \pm m$	3,26 ± 0,22		
2 (контроль)	26	0,00	+	положит.
	27	0,00	+	положит.
	28	0,00	+	положит.
	29	0,00	+	положит.
	30	0,00	+	положит.
	31	0,00	+	положит.
	32	0,00	+	положит.
	33	0,00	+	положит.
	34	0,00	+	положит.
	35	0,00	+	положит.
	$M \pm m$	0,00		

«+» — наличие клинических признаков бешенства и специфическая гибель животного;
«—» — отсутствие клинических признаков бешенства.

Таблица 4

Результаты заражения контрольным штаммом вируса бешенства CVS-27 енотовидных собак через месяц после иммунизации вакциной «Ферарабивак» ($n_{\text{иссл.}} = 3, p < 0,05$)

Table 4

Challenge of racoon dogs with CVS 27 strain one month post vaccination with Ferarabivac ($n = 3, p < 0,05$)

Номер группы	Номер животного	Титр антирабических ВНА в реакции нейтрализации, МЕ/см ³	Результаты контрольного заражения	
			Наличие/отсутствие клинических признаков бешенства	Исследование головного мозга в РИФ
1 (опытная)	1	3,45 ± 0,24	—	отрицат.
	2	3,41 ± 0,21	—	отрицат.
	3	3,58 ± 0,19	—	отрицат.
	4	3,35 ± 0,19	—	отрицат.
	5	3,39 ± 0,22	—	отрицат.
	6	3,47 ± 0,21	—	отрицат.
	7	3,61 ± 0,20	—	отрицат.
	8	3,74 ± 0,26	—	отрицат.
	9	3,50 ± 0,27	—	отрицат.
	10	3,40 ± 0,25	—	отрицат.
	11	3,58 ± 0,21	—	отрицат.
	12	3,51 ± 0,24	—	отрицат.
	13	3,39 ± 0,21	—	отрицат.
	14	3,58 ± 0,25	—	отрицат.
	15	3,60 ± 0,20	—	отрицат.
	16	3,48 ± 0,24	—	отрицат.
	17	3,55 ± 0,28	—	отрицат.
	18	3,64 ± 0,20	—	отрицат.
	19	3,48 ± 0,22	—	отрицат.
	20	3,49 ± 0,27	—	отрицат.
	21	3,51 ± 0,19	—	отрицат.
	22	3,49 ± 0,27	—	отрицат.
	23	3,70 ± 0,27	—	отрицат.
	24	3,76 ± 0,21	—	отрицат.
	25	3,69 ± 0,26	—	отрицат.
	$M \pm m$	3,78 ± 0,23		
2 (контроль)	26	0,00	+	положит.
	27	0,00	+	положит.
	28	0,00	+	положит.
	29	0,00	+	положит.
	30	0,00	+	положит.
	31	0,00	+	положит.
	32	0,00	+	положит.
	33	0,00	+	положит.
	34	0,00	+	положит.
	35	0,00	+	положит.
	$M \pm m$	0,00		

«+» — наличие клинических признаков бешенства и специфическая гибель животного;
«—» — отсутствие клинических признаков бешенства.

Таблица 5

Исследование продолжительности иммунитета в течение 12 месяцев у диких животных, иммунизированных вакциной «Ферарабивак» ($n_{\text{иссл.}} = 3, p < 0,05$)

Table 5

A 12-months' study of immunity duration in wild animals vaccinated with Ferarabivac ($n = 3, p < 0.05$)

Срок после вакцинации, месяц	Титр антирабических ВНА в реакции нейтрализации, МЕ/см ³	
	лисицы	енотовидные собаки
0,5	0,70 ± 0,31	0,70 ± 0,29
1	3,20 ± 0,22	3,50 ± 0,22
2	4,30 ± 0,32	4,51 ± 0,27
3	3,71 ± 0,35	3,80 ± 0,41
4	3,55 ± 0,41	3,62 ± 0,25
5	3,46 ± 0,23	3,46 ± 0,35
6	3,00 ± 0,31	3,10 ± 0,43
8	2,30 ± 0,19	2,63 ± 0,23
9	1,89 ± 0,37	2,01 ± 0,19
10	1,21 ± 0,15	1,53 ± 0,25
12	0,62 ± 0,28	0,71 ± 0,17

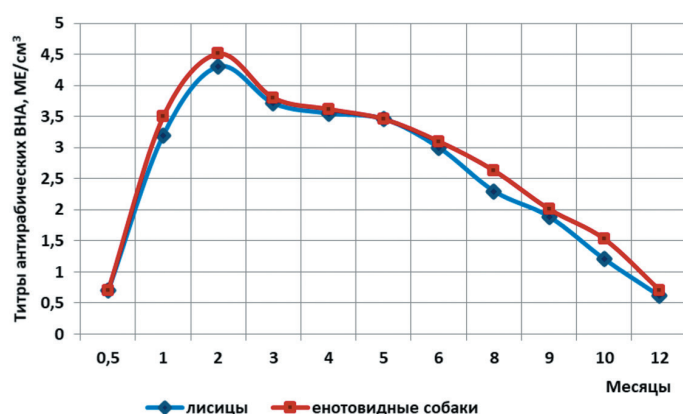


Рис. 2. Длительность иммунитета против бешенства у лисиц и енотовидных собак, вакцинированных антирабической живой оральной вакциной «Ферарабивак»

Fig. 2. Immunity duration in foxes and raccoon dogs vaccinated with Ferarabivac anti-rabies live oral vaccine

вируса бешенства через месяц после иммунизации для лисиц и енотовидных собак составили $3,24 \pm 0,08$ и $3,26 \pm 0,22$ МЕ/см³ соответственно. Контрольные животные пали на 12–20 сут после заражения. Специфичность падежа была подтверждена в РИФ. Наблюдение за оставшимися животными продолжалось еще в течение 90 сут после гибели последнего контрольного животного. По истечении срока наблюдения животных подвергли эвтаназии и исследовали головной мозг в РИФ. В исследованных пробах головного мозга вирус бешенства обнаружен не был.

На заключительном этапе работы проводили исследование по продолжительности иммунитета у 25 лисиц и 25 енотовидных собак, которые были вакцинированы препаратом «Ферарабивак» в дозе 2,0 см³ с титром инфекционной активности аттенуированного вируса бешенства штамма РВ-97 не менее 6,0 Ig ККИД₅₀/см³. В течение года за животными вели наблюдение и пе-

риодически брали пробы крови для определения наличия антирабических ВНА. Результаты исследования представлены в таблице 5 и на рисунке 2.

По результатам, представленным в таблице 5 и на рисунке 2, можно сделать вывод, что после иммунизации лисиц вакциной «Ферарабивак» ВНА против вируса бешенства обнаружены уже после однократного применения через 0,5 месяца в титре $0,70 \pm 0,31$ МЕ/см³. Уровень антирабических антител достигал пика к 2 месяцам и составлял $4,30 \pm 0,32$ МЕ/см³, а затем начал постепенно снижаться и через 6 месяцев составил $3,00 \pm 0,31$ МЕ/см³, через 12 месяцев – $0,62 \pm 0,28$ МЕ/см³.

После иммунизации енотовидных собак вакциной «Ферарабивак» антирабические ВНА обнаружены после однократного поедания через полмесяца в титре $0,70 \pm 0,29$ МЕ/см³. Уровень антирабических антител достигал пика к 2 месяцам и составлял $4,51 \pm 0,27$ МЕ/см³, а затем постепенно снижался и через 6 месяцев соответствовал значениям $3,10 \pm 0,43$ МЕ/см³, через 12 месяцев – $0,71 \pm 0,17$ МЕ/см³. Иными словами, антирабическая живая вакцина «Ферарабивак» обеспечивала защиту диких плотоядных животных от бешенства в течение 12 месяцев, поскольку титр антирабических ВНА был $\geq 0,5$ МЕ/см³, что соответствует требованиям МЭБ, предъявляемым к антирабическим вакцинам [4]. Минимальный пороговый уровень ВНА определен через 12 месяцев после иммунизации, что доказывает необходимость проведения повторной вакцинации животных против бешенства через год.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование иммуногенных и протективных свойств антирабической живой оральной вакцины «Ферарабивак» для диких плотоядных животных.

Определено, что оптимальная иммунизирующая доза препарата составляет 2,0 см³ с титром инфекционной активности аттенуированного вируса бешенства штамма РВ-97 не менее 6,00 Ig ККИД₅₀/см³.

Выявлено, что через 14 сут после оральной иммунизации данной вакциной антирабические антитела обнаружены в сыворотке крови лисиц и енотовидных собак в титрах $0,70 \pm 0,18$ и $0,73 \pm 0,19$ МЕ/см³ соответственно, что обеспечивало защиту от заражения вирусом бешенства ($\geq 0,50$ МЕ/см³). Спустя 50 сут уровень антирабических ВНА у лисиц достигал максимальных значений и составлял $4,30 \pm 0,32$ МЕ/см³. Далее наблюдалось снижение титра ВНА, но при этом через 90 сут он оставался на высоком уровне и составлял $3,70 \pm 0,35$ МЕ/см³. Титр ВНА у енотовидных собак, вакцинированных препаратом «Ферарабивак», достигал максимальных значений спустя 50 сут и был равен $4,53 \pm 0,27$ МЕ/см³, а затем постепенно снижался и через 90 сут после иммунизации составлял $3,80 \pm 0,41$ МЕ/см³. Минимальный пороговый уровень ВНА определен через 12 месяцев после иммунизации и составлял у лисиц и енотовидных собак $0,62 \pm 0,28$ и $0,71 \pm 0,17$ МЕ/см³ соответственно, что доказывает необходимость проведения повторной вакцинации животных против бешенства через год.

Установлено, что в результате контрольного заражения через 30 сут после вакцинации все животные, иммунизированные антирабической живой вакциной «Ферарабивак», в течение всего срока наблюдения не проявляли клинических признаков бешенства. Средние значения титров антител против вируса бешенства через месяц после иммунизации у лисиц и енотовидных собак

составили $3,24 \pm 0,08$ и $3,26 \pm 0,22$ МЕ/см³ соответственно. Контрольные животные пали на 12–20 сут после заражения. Специфичность падежа была подтверждена в РИФ. Наблюдение за оставшимися животными продолжалось еще в течение 90 сут после гибели последнего контрольного животного. По истечении срока наблюдения животных подвергли эвтаназии и подтвердили в РИФ отсутствие вируса бешенства в тканях головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 4, 5, 7, 10 см. REFERENCES)

- Чупин С. А., Доронин М. И., Чернышова Е. В., Шульпин М. И. Генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Владимирской области. *Ветеринария сегодня*. 2015; 4 (15): 46–48. eLIBRARY ID: 25596872.
- Груздев К. Н., Метлин А. Е. Бешенство животных. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 394 с.
- Макаров В. В., Лозовой Д. А., Брико Н. И. Бешенство рукокрылых и человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 6: 46–53. eLIBRARY ID: 25134001.
- Рыбаков С. С., Белик Е. В., Метлин А. Е., Борисов В. В., Назаров Н. А., Егоров А. А., Чернышова Е. В., Михалишин В. В. Безопасность и иммуногенность оральных антирабических вакцин. *Ветеринария*. 2010; 8: 18–22. eLIBRARY ID: 15198430.
- Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT) (МУ 37-16). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. 19 с.
- Гусев А. А., Авилов В. М., Бабак В. А., Пунтус И. А., Смаилова А. С. Экспериментальный метод оценки иммуногенности живой вакцины против бешенства диких животных. *Ветеринария Кубани*. 2019; 3: 7–9. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-3-7-9.
- Метлин А. Е., Рыбаков С. С., Михалишин В. В., Muller T. Оральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства. *Ветеринария*. 2009; 8: 18–25. eLIBRARY ID: 12930952.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. д-ра физ.-мат. наук Ю. А. Данилова; под ред. Н. Е. Бузикашвили, Д. В. Самойлова. М.: Практика; 1999. 459 с.
- Чернышова Е. В., Сухарьков А. Ю., Метлин А. Е., Белик Е. В., Назаров Н. А., Чепуркин А. В., Рыбаков С. С. Методические указания по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2010. 23 с.
- Методические указания для диагностики бешенства животных в реакции иммунофлуоресценции: утв. Россельхознадзором 13.09.2017 (МУ 33-17). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2017. 14 с.

REFERENCES

- Chupin S. A., Doronin M. I., Chernyshova E. V., Shulpin M. I. Genetic characterization of rabies virus isolates detected in the territory of the Vladimir Oblast. *Veterinary Science Today*. 2015; 4 (15): 46–48. eLIBRARY ID: 25596872. (in Russian)
- Gruzdev K. N., Metlin A. E. Animal Rabies. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2019. 394 p. (in Russian)

- Makarov V. V., Lozovoy D. A., Briko N. I. Cheiropter rabies and man. *Epidemiology and infectious diseases. Current items*. 2015; 6: 46–53. eLIBRARY ID: 25134001. (in Russian)
- Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris; 2018; Chap. 3.1.17: 578–612. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf.
- Fooks A. R., Banyard A. C., Horton D. L., Johnson N., McElhinney L. M., Jackson A. C. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet*. 2014; 384 (9951): 1389–1399. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5.
- Rybakov S. S., Belik E. V., Metlin A. E., Borisov V. V., Nazarov N. A., Egorov A. A., Chernyshova E. V., Mikhailishin V. V. Safety and immunogenicity of oral anti-rabies vaccines. *Veterinariya*. 2010; 8: 18–22. eLIBRARY ID: 15198430. (in Russian)
- Freuling C. M., Eggerbauer E., Finke S., Kaiser C., Kaiser C., Kretzschmar A., Nolden T., Ortmann S., Schröder C., Teifke J. P., Schuster P., Vos A., Mettenleiter T. C., Müller T. Efficacy of the oral rabies virus vaccine strain SPBN GASGAS in foxes and raccoon dogs. *Vaccine*. 2019; 37 (33): 4750–4757. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.093.
- Guidelines for determining the rabies virus neutralizing antibody level in the blood sera of wild carnivorous animals by VNT in BHK-21 cell culture (RFFIT) (МУ 37-16) [Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu virusnejtralizuyushchih antitel k virusu beshenstva v syvorotkah krvi dikih plotoyadnykh zhivotnykh v reakcii nejtralizatsii v kul'ture kletok VNK-21 (RFFIT) (МУ 37-16)]. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2016. 19 p. (in Russian)
- Gusev A. A., Avilov V. M., Babak V. A., Puntus I. A., Smailova A. S. Experimental method for immunogenicity evaluation of live vaccines against rabies in wild animals. *Veterinaria Kubani*. 2019; 3: 7–9. DOI: 10.33861/2071-8020-2019-3-7-9. (in Russian)
- Müller T. F., Schuster P., Vos A. C., Selhorst T., Wenzel U. D., Neubert A. M. Effect of maternal immunity on the immune response to oral vaccination against rabies in young foxes. *Am. J. Vet. Res.* 2001; 62 (7): 1154–1158. DOI: 10.2460/ajvr.2001.62.1154.
- Metlin A. E., Rybakov S. S., Mikhailishin V. V., Muller T. Oral vaccination of wild carnivorous animals against rabies. *Veterinariya*. 2009; 8: 18–25. eLIBRARY ID: 12930952. (in Russian)
- Glants S. Medico-biological statistics: translated from English. Dr. of Sciences (Physics and Mathematics) Yu. A. Danilova; ed. by N. E. Buzikashvili, D. V. Samoilov. M.: Practice; 1999. 459 p. (in Russian)
- Chernyshova E. V., Sukharkov A. Yu., Metlin A. E., Belik E. V., Nazarov N. A., Chepurkin A. V., Rybakov S. S. Methodological guidelines for the selection and transfer of brain samples, blood sera and bone tissue to diagnose animal rabies and assess the effectiveness of oral rabies vaccines [Metodicheskie ukazaniya po otboru i peresylke prob golovnogo mozga, syvorotok krvi i kostnoj tkani s cel'yu diagnostiki beshenstva zhivotnykh i ocenki effektivnosti oral'nykh antirabicheskikh vakcin]. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2010. 23 p. (in Russian)
- Guidelines for animal rabies diagnosis using immunofluorescence test [Metodicheskie ukazaniya dlya diagnostiki beshenstva zhivotnykh v reakcii immunofluorescencii]: approved by the Rosselkhoz nadzor 13.09.2017 (МУ 33-17). Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2017. 14 p. (in Russian)

Поступила 13.01.20

Принята в печать 14.02.20

Received on 13.01.20

Approved for publication on 14.02.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Шишков Александр Валерьевич, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, заместитель директора по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Борисов Алексей Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Alexander V. Shishkov, Leading Veterinarian of the Laboratory for FMD Prevention FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research and Development of the FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey V. Borisov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher of the Laboratory for FMD Prevention of the FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry V. Mikhailishin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Laboratory for FMD Prevention of the FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Опыт борьбы с африканской чумой свиней в Российской Федерации и его значение для других стран

К. Н. Груздев¹, А. К. Караулов², А. С. Иголкин³

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0003-3159-1969, e-mail: gruzdev@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-5438-8026, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены основные характеристики африканской чумы свиней как наиболее важной трансграничной инфекции с катастрофическим разрушительным потенциалом для свиноводства. Появившись в Грузии в 2007 г., АЧС распространилась среди домашних свиней и кабанов на территории европейской части Российской Федерации. Затем вирус АЧС был обнаружен в Беларуси, на Украине, а с 2014 г. заболевание стали регистрировать в странах Евросоюза. Распространившись на территории Европы, африканская чума свиней приняла характер широкой эпизоотии, вызванной вирусом АЧС II генотипа, с трендом на ухудшение ситуации. Описан современный ареал распространения АЧС в Российской Федерации, странах Европы, Китае и Азии. В настоящее время болезнь является самой серьезной проблемой эпизоотологии ввиду: чрезвычайно большого прямого ущерба (высокой летальности восприимчивых животных); способности к возникновению и эпизоотическому распространению в самых неожиданных регионах мира; отсутствия средств специфической профилактики и лечения. В России накоплен богатый опыт предотвращения возникновения, распространения и ликвидации этой болезни. Разработан и внедрен научно обоснованный комплекс мер по профилактике и ликвидации АЧС, доказавший свою эффективность в условиях борьбы с данным заболеванием свиней. В основу комплекса мер положены: обеспечение биобезопасности по всей производственной цепочке предприятий, связанных с разведением, содержанием, убоем, переработкой, хранением, перемещением и реализацией живых свиней и свиноводческой продукции, независимо от форм собственности; регуляция численности популяции кабана; совершенствование проблемных вопросов по обращению с биологическими отходами. Опыт борьбы с АЧС в Российской Федерации можно рекомендовать другим неблагоприятным по данному заболеванию странам, но с адаптацией его к конкретному региону с учетом местного социально-экономического состояния.

Ключевые слова: африканская чума свиней (АЧС), биологическая безопасность, комплекс мер по противодействию АЧС, опыт борьбы с АЧС.

Для цитирования: Груздев К. Н., Караулов А. К., Иголкин А. С. Опыт борьбы с африканской чумой свиней в Российской Федерации и его значение для других стран. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 38–43. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-38-43.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Груздев Константин Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: gruzdev@arriah.ru.

Experience in African swine fever control in the Russian Federation and its value for the other countries

K. N. Gruzdev¹, A. K. Karaulov², A. S. Igolkin³

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0003-3159-1969, e-mail: gruzdev@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-5438-8026, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

SUMMARY

Basic characteristics of African swine fever, being one of the most significant transboundary infections with a devastating potential for pig production, are presented in the paper. It occurred in Georgia for the first time in 2007 and spread among domestic pigs and wild boar in the European part of the Russian Federation. After that, ASF virus was detected in Belarus, Ukraine and since 2014, the disease has been reported in the European countries. Having spread in Europe, African swine fever became an epizooty, caused by ASFV genotype II and exhibiting a deteriorating trend. Modern ASF infected areas in the Russian Federation, Europe, China and Asia are described. Currently the disease is the most serious epidemiological problem due to huge losses (high mortality among susceptible animals); ability to occur and spread in the most unexpected parts of the world and absence of specific prevention tools and means. Russia has developed a high level of expertise in the disease prevention, control and eradication. A scientifically justified set of measures to prevent and eradicate ASF, which has proved its effectiveness in the disease control, was developed and introduced. The core of this set is formed by biosafety assurance along the whole production chain at the establishments of any

type of ownership involved into breeding, keeping, slaughter, processing, storage, movement and marketing of live pigs and pig products; by wild boar population control and improvement of waste management approaches. Other ASF infected countries can benefit from the Russian Federation's experience in ASF control by adapting it to the concrete region with due regard to local social and economic conditions.

Key words: African swine fever (ASF), biological safety, ASF control measures, experience in ASF control.

For citation: Gruzdev K. N., Karaulov A. K., Igolkin A. S. Experience in African swine fever control in the Russian Federation and its value for the other countries. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 38–43. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-38-43.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Konstantin N. Gruzdev, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher of Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: gruzdev@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) (лат. *Pestis africana suum*; англ. African swine fever; болезнь Монтгомери) – контагиозная болезнь свиней, протекающая остро, подостро, хронически, бессимптомно и характеризующаяся лихорадкой, геморрагическим диатезом, воспалительными и некротическими изменениями паренхиматозных органов. Возбудитель – ДНК-содержащий вирус семейства *Asfarviridae*, рода *Asfivirus*. В естественных условиях заболеванию подвержены домашние свиньи и кабаны всех возрастов и пород в любое время года.

Это экзотическое для стран Европы и Азии заболевание является энзоотическим во многих африканских странах, где циркулирует более 24 генотипов возбудителя, и на острове Сардиния. В 2007 г. АЧС была впервые зарегистрирована в Грузии у домашних свиней и кабанов, попав в дикую природу, болезнь распространилась на территории приграничных стран. Появление АЧС в Грузии способствовало проникновению вируса в популяцию свиней в Российской Федерации. Затем АЧС была обнаружена на Украине, в Беларуси, а с 2014 г. начала регистрироваться в странах Евросоюза. Распространившись на территории Европы, болезнь приняла характер широкой эпизоотии, вызванной вирусом АЧС II генотипа, с трендом на ухудшение ситуации. С этого времени идет лавинообразное диффузное распространение АЧС [1].

Неблагополучными к настоящему времени являются девять европейских стран. Менее чем за 5 лет после появления АЧС в Литве болезнь распространилась на огромную территорию – в Латвию, Эстонию, Польшу, Чехию, Венгрию, Румынию, Болгарию, Бельгию, Словакию, Сербию.

В Китае, крупнейшем производителе свинины в мире, первая в истории вспышка АЧС зарегистрирована в 2018 г. К 2020 г. АЧС регистрировали на территории многих государств Юго-Восточной Азии. Прогноз неблагоприятен, поэтому клуб стран, неблагополучных по АЧС, может быть расширен.

Африканская чума свиней на данном этапе – наиболее важная трансграничная инфекция с катастрофическим потенциалом, одна из самых серьезных проблем эпизоотологии ввиду чрезвычайно большого прямого ущерба (высокая летальность восприимчивых животных), способностью к возникновению и эпизоотическому распространению в самых неожиданных регионах мира, отсутствия средств специфической профилактики и лечения [2]. Анализ развития эпизоотического процесса при АЧС показал, что наибольшее число вспышек

среди свиней происходит в личных подсобных хозяйствах (ЛПХ), крестьянских фермерских хозяйствах (КФХ), мелкотоварных хозяйствах, а затем идут крупные свиноводческие предприятия промышленного типа [3].

Как показывает практика, среди методов борьбы с АЧС на первое место выходит обеспечение биологической безопасности свиноводческого хозяйства. Финансировать ее в полном объеме может только крупное предприятие, поскольку это требует значительных вложений.

Кабан – равноценный участник эпизоотического процесса при АЧС. Популяция кабана подлежит жесткой регуляции, т. к. о биобезопасности говорить не приходится. Наглядная трансграничность заболевания и роль дикого кабана продемонстрирована как в России, странах Евросоюза, так и в других странах.

В России разработан и внедрен комплекс мер по противодействию АЧС, который оправдал себя как эффективный подход к решению проблемы. Для объективного контроля ведется постоянный мониторинг, анализ и моделирование развития эпизоотической ситуации, дается ежегодный прогноз. В условиях неблагоприятного развития событий по АЧС возникает необходимость расширения международного сотрудничества по контролю данного заболевания и обмена опытом борьбы, а также усиления пропаганды знаний по профилактике и ликвидации АЧС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали официальные данные Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), ФГБУ «Центр ветеринарии» МСХ РФ, информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» об эпизоотической ситуации на территории Российской Федерации и стран мира по АЧС с 2007 г.; данные из открытых источников о мерах борьбы с АЧС в неблагополучных странах.

Анализ развития эпизоотии в Российской Федерации и других странах проводили ретроспективно. Общие тренды развития эпизоотии АЧС выражали графически и картографически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Африканская чума свиней, возникнув и распространившись в Грузии в 2007 г., проникла на территорию других сопредельных стран: в Армению, Азербайджан, Иран, а также Россию (рис. 1).

К 2020 г. она затронула многие регионы России, охватила страны Восточной Европы и Прибалтики, поразила свиноводство Китая, Северной и Южной Кореи,



Рис. 1. Проникновение АЧС на территорию России в 2007 г.

Fig. 1. ASF introduction into the Russian territory in 2007

(https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2015/asf_chronology_15.pdf)

страны Юго-Восточной Азии. Человечество не знало такой масштабной панзоотии среди животных.

Как считают эксперты, наибольший урон АЧС может нанести странам Азии, где сосредоточено около 80% мирового поголовья свиней. Свыше 500 млн голов свиней насчитывается в Китае. Убытки этой страны от АЧС к 2020 г. достигли триллиона юаней [4].

Борьба с АЧС в Китае, Южной Корее, Вьетнаме, Лаосе, Камбодже, на Филиппинах осложняется спецификой ведения свиноводства: большинство животных содержится на мелкотоварных фермах и в личных подсобных хозяйствах, не имеющих надлежащего уровня биологической защиты; слабый учет, недостаточно контролируемое, а в некоторых случаях и совсем бесконтрольное перемещение (часто нелегальное) на большие расстояния потенциально опасных товаров (свиней, продукции свиноводства, кормов для свиней); слабо развитая инфраструктура убой, переработки свиней, хранения и реализации свиноводческой продукции; использование для кормления пищевых отходов.

Для контроля и ликвидации АЧС требуется обобщение мирового опыта борьбы с заболеванием в современных условиях. На встрече постоянной группы экспертов по АЧС в Хошимине эксперты обсудили, как предотвратить стремительное распространение болезни в странах Азии. С учетом основных причин распространения АЧС в странах азиатского региона, участники встречи пришли к заключению, что основным направлением борьбы с эпизоотией должно стать повышение уровня биологической безопасности по всей производственной цепочке свиноводческих предприятий (фермы, бойни, перерабатывающие заводы, холодильные склады и т. д.) [5].

Средние темпы эпизоотии АЧС в 2007–2017 гг. на территории Евразии составили 1,273 страны в год [3]. Оценка скорости распространения АЧС в Китае

и странах Юго-Восточной Азии, в связи со взрывным характером проявления неблагополучия АЧС в различных регионах, представляет определенные трудности (рис. 2.)

На наш взгляд, в странах, которые впервые сталкиваются с АЧС, часто делают системные ошибки: не принимаются решительных мер по профилактике и ликвидации заболевания (быстрая диагностика, наложение ограничений, уничтожение зараженных свиней и продукции, утилизация биологических отходов) с учетом высокой устойчивости вируса АЧС к внешним факторам и сохранению его в природной среде; недостаточное внимание уделяется вопросу регулирования популяций дикого кабана (как одного из ключевых факторов в распространении и закреплении АЧС в природе); отмечается слабая просветительская работа среди населения и недостаточный уровень знаний об опасности АЧС не только у фермеров, но и у ветеринарного персонала.

В нашей стране накоплен богатый опыт предотвращения возникновения, распространения и ликвидации этой болезни [3]. Он показывает, что добиться высокого уровня биобезопасности в ЛПХ практически невозможно. Поэтому в сложившихся эпизоотических условиях по АЧС необходимо последовательно консолидировать свиноводческое производство на коммерческих предприятиях крупного и среднего размера в регионах, свободных от заболевания, применяя систему компартментализации (оценку зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств). Мелкотоварным фермам и личным подсобным хозяйствам следует переходить на альтернативные формы животноводства – птицеводство, кролиководство, а там, где позволяют земельные ресурсы, то и овцеводство, козоводство, мясное и молочное скотоводство. Применяемый российской ветеринарной службой комплексный подход к повышению уровня биологической защиты всех объектов,

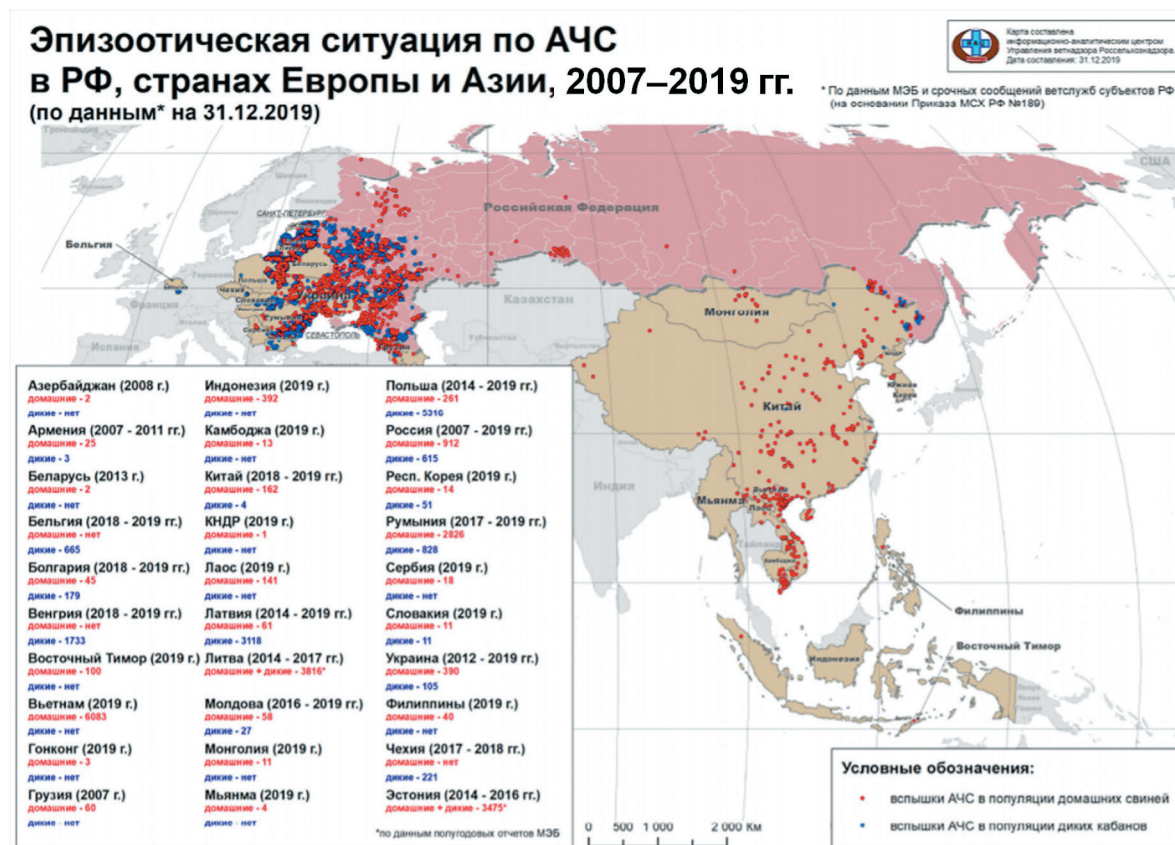


Рис. 2. Вспышки АЧС в странах Европы и Азии в 2007–2019 гг.

Fig. 2. ASF outbreaks in Europe and Asia in 2007–2019 (<https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2019/12-31/05.pdf>)

задействованных в производственном цикле, регионализация территории страны, компартментализация предприятий и использование электронной ветеринарной сертификации перемещаемой продукции доказали свою эффективность. В настоящее время данный подход известен мировому сообществу (МЭБ и FAO). Теперь Китай и Вьетнам, которые находятся в бедственном положении, осваивают российский опыт.

Проводя ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по АЧС в РФ за последние три года, нужно отметить наметившийся тренд снижения количества вспышек как в популяции домашних свиней, так и кабанов (рис. 3).

В основе этого лежат 3 постулата:

1. Обеспечение биобезопасности по всей производственной цепочке предприятий, связанных с разведением, содержанием, убоем, переработкой, хранением, перемещением и реализацией живых свиней и свиноводческой продукции, независимо от форм собственности.

2. Регуляция численности популяции кабана.

3. Решение проблемных вопросов по обращению с биологическими отходами.

В Российской Федерации были разработаны региональные программы борьбы с АЧС, изыскивались механизмы их реализации и финансового наполнения. В то же время на федеральном уровне создавались координирующие структуры (комиссии, штабы) – сначала при Минсельхозе, затем на уровне Правительства России. Были приняты научно обоснованные федеральные законы с большим стратегическим потенциалом,

оказывающие реальное воздействие на предотвращение вспышек заболеваний и ликвидацию очагов АЧС. Вот только некоторые из них: более 12 раз вносились изменения и дополнения в закон «О ветеринарии»; в федеральный закон «Об охоте и о сохранении охотничьих ресурсов и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Выпущены многочисленные приказы Минсельхоза России и Минприроды России, в том числе зарегистрированные в Минюсте России:

– Приказ Минсельхоза России от 23.07.2010 № 258 (ред. от 15.10.2013) «Об утверждении Правил определения зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств, а также организаций, осуществляющих убой свиней, переработку и хранение продукции свиноводства» (зарегистрировано в Минюсте России 12.11.2010 № 18944);

– Приказ Минсельхоза России от 29.03.2016 № 114 «Об утверждении Ветеринарных правил содержания свиней в целях их воспроизводства, выращивания и реализации» (зарегистрировано в Минюсте России 04.07.2016 № 42749);

– Приказ Минсельхоза России от 14.12.2015 № 635 «Об утверждении Ветеринарных правил проведения регионализации территории РФ» (зарегистрировано в Минюсте России 23.03.2016 № 1508);

– Приказ Минсельхоза России от 22.04.2016 № 161 «Об утверждении Перечня видов животных, подлежащих идентификации и учету»;

– РД-АПК 3.10.07.05-17. Ветеринарно-санитарные требования при проектировании, строительстве,

реконструкции и эксплуатации животноводческих помещений (Москва, 2017);

– Приказ Минсельхоза России от 31.05.2016 № 213 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов африканской чумы свиней» (зарегистрировано в Минюсте России 24.08.2016 № 43379);

– Приказ Минсельхоза России от 06.07.2017 № 329 «Об утверждении ветеринарных правил перемещения (перевозки) автомобильным транспортом свиней и кормов для них» (зарегистрировано в Минюсте России 03.08.2017 № 47649);

– Приказ Россельхознадзора от 19.03.2018 № 235 «Об утверждении форм проверочных листов (списков контрольных вопросов), используемых должностными лицами территориальных органов Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору при проведении плановых проверок в рамках осуществления федерального государственного ветеринарного контроля (надзора)»;

– Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30.09.2016 № 2048-р «Об утверждении плана действий по предотвращению заноса на территорию Российской Федерации африканской чумы свиней и ее распространения на территории Российской Федерации;

и ряд других документов, которые постоянно дополняются и уточняются.

Путь к наведению порядка лежит также и в сфере повышения ответственности владельцев животных за нарушения требований ветеринарного законодательства и ветеринарно-санитарных правил. Частные лица и бизнес уже ощутили действие судебно-правовой практики.

Основным достижением России, на наш взгляд, является осознание всеми слоями нашего общества, что АЧС – это страшная беда!!! Она затрагивает каждого человека в отдельности, а также власти различного уровня и бизнес.

Для борьбы с АЧС нет исключений из утвержденных ветеринарных правил. В условиях отсутствия средств специфической профилактики и лечения важно повышать требования к биозащите свиноводческих предприятий различных компартментов, особенно промышленных комплексов, проводить политику внедрения альтернативного животноводства.

Опыт России по борьбе с АЧС в современном мире бесценен. Разработанный комплекс мер позволил в условиях проявления АЧС сохранить и развить свиноводство как отрасль: год за годом идет рост свиноголовья, повышается продуктивность и производство свинины. По данным Национального союза свиноводов России, с 2005 по 2018 г. общее ежегодное производство свинины выросло в 2,4 раза [6]. Международным экспертным сообществом признан тот факт, что Россия становится экспортером свинины [7].

Этому способствуют перспективные разработки, проводимые Россельхознадзором и подведомственным ему ФГБУ «ВНИИЗЖ»: регионализация страны,

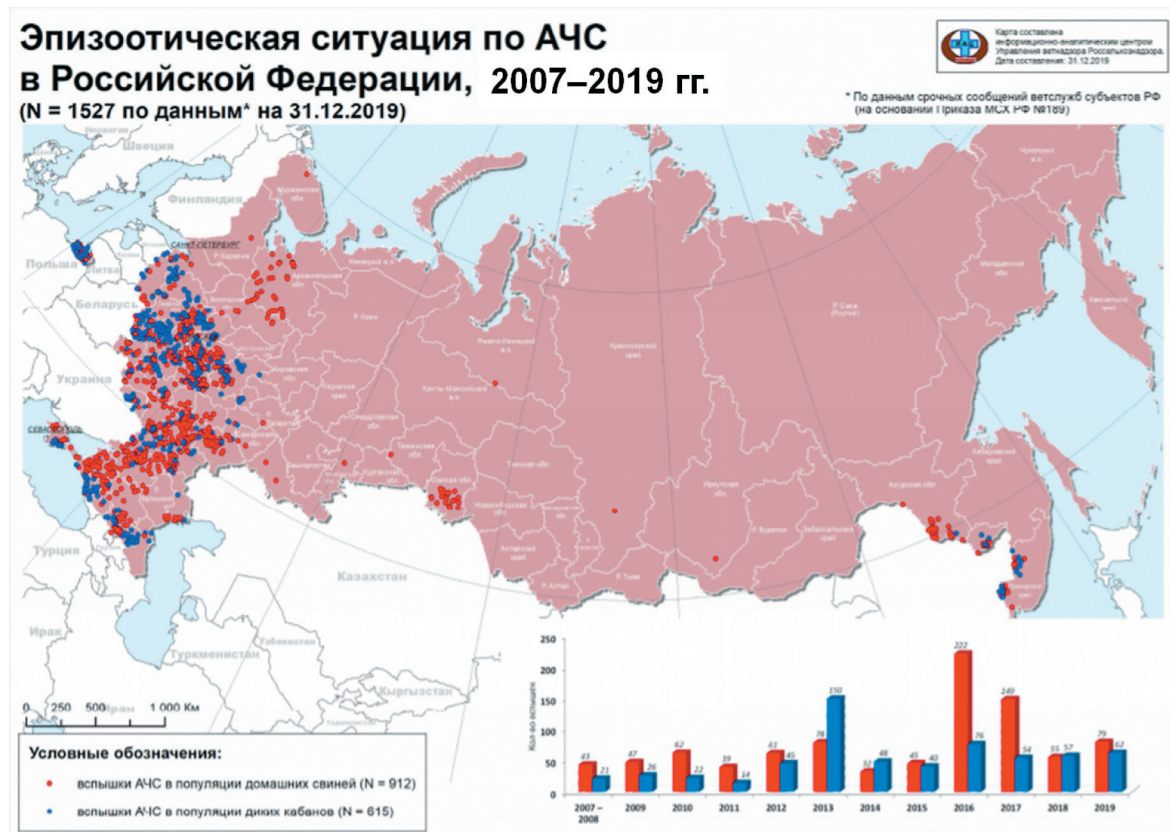


Рис. 3. Тренд снижения количества вспышек АЧС в России с 2016 г.

Fig. 3. Declining trend in the number of ASF outbreaks in Russia since 2016
(<https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2019/12-31/03.pdf>)

учет животных, внедрение электронной сертификации (ФГИС «Меркурий») и др.

Реализация Указа Президента РФ от 07.05.2018 № 204 предусматривает доведение экспорта продукции АПК до 45 млрд долларов в 2024 г., в том числе предполагается значительное увеличение производства свинины. Поэтому всем придется напряженно работать и выполнять разработанный комплекс мер по борьбе с АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В Российской Федерации разработан практический комплекс мер по профилактике и ликвидации АЧС, включающий нормативную базу на федеральном, региональном уровне и работу на местах, доказавший свою эффективность в условиях борьбы с данным заболеванием свиней.

2. Интенсивное промышленное свиноводство позволяет вести планомерную борьбу с АЧС и имеет неоспоримое преимущество перед мелкотоварным производством свинины, включая личные подсобные хозяйства.

3. Промышленное производство свинины при соблюдении разработанных и научно обоснованных требований обеспечения биобезопасности по всей производственной цепочке предприятий, связанных с разведением, содержанием, убоем, переработкой, хранением, перемещением и реализацией живых свиней и свиноводческой продукции, независимо от форм собственности, регионализации РФ, электронной сертификации, способно оптимальным образом вносить свой вклад в решение вопросов продовольственной безопасности страны и экспортной составляющей мясной продукции.

4. Опыт борьбы с АЧС в Российской Федерации можно рекомендовать другим неблагополучным по АЧС странам, но с адаптацией его к местному социально-экономическому состоянию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 2, 5, 7 см. REFERENCES)

1. Журавлева В. А., Лыска В. М., Васильев А. П., Шкаев А. Э., Стрижакова О. М., Сидлик М. В. Структура современного ареала распростране-

ния африканской чумы свиней в Российской Федерации. *Ветеринария*. 2017; 11: 3–6.

3. Оганесян А. С., Шибаев М. А., Баскакова Н. Е., Коренной Ф. И., Караулов А. К. Эпизоотия африканской чумы свиней 2007–2017 гг. Часть 1. Общие тренды АЧС на территории Российской Федерации и Евразии. *Ветеринария сегодня*. 2018; 2 (25): 18–25. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-2-25-18-25.

4. Триллион: Китай подсчитал убытки от АЧС. ЭКД! Опубликовано 26.09.2019. Режим доступа: <http://ekd.me/2019/09/trillion-kitaj-podschital-ubytki-ot-achs/>.

6. Ковалев Ю. И. Реальный риск перенасыщения рынка свинины в 2020–2023 гг.: предпосылки, вызовы, возможности. *XI Международная научно-практическая конференция «Свиноводство – 2019. Глобальные вызовы 2020 года: сумеем ли мы найти ответы?» (Москва, 3–5 декабря 2019 г.)*. М., 2019.

REFERENCES

1. Zhuravleva V. A., Lyska V. M., Vasilyev A. P., Shkayev A. E., Strizhakova O. M., Sidlik M. V. Structure of African swine fever geographic spread in the Russian Federation. *Veterinariya*. 2017; 11: 3–6. (in Russian)

2. EFSA, Depner K., Gortazar C., Guberti V., Masiulis M., More S., Ojševiskis E., Thulke H.-H., Viltrop A., Woźniakowski G., Cortiñas Abrahantes J., Gogin A., Verdonck F., Dhollander S. Epidemiological analyses of African swine fever in the Baltic States and Poland (Update September 2016 – September 2017). *EFSA J*. 2017; 15 (11):5068. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5068.

3. Oganessian A. S., Shibayev M. A., Baskakova N. E., Korennoy F. I., Karaulov A. K. African swine fever epidemiology in 2007–2017. Part 1. General ASF spreading trends in the Russian Federation and Eurasia. *Veterinary Science Today*. 2018; 2 (25): 18–25. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-2-25-18-25. (in Russian)

4. One trillion: China has calculated damages caused by ASF. *EKD!* Published on 26.09.2019. Available at: <http://ekd.me/2019/09/trillion-kitaj-podschital-ubytki-ot-achs/>. (in Russian)

5. 3rd Meeting of SGE on ASF for Asia & 4th Regional Workshop on Swine Disease in Asia (26–28 November 2019, Ho Chi Minh City, Vietnam). Available at: <https://rr-asia.oie.int/en/events/3rd-meeting-of-sge-on-afs-for-asia-4th-regional-ws-on-sd-in-asia/>; <https://www.fsvps.ru/fsvps/news/33200.html>.

6. Kovalyov Yu. I. Real risks of pork market over-saturating in 2020–2023: prerequisites, challenges, possibilities. *XIth International Scientific and Practical Conference “Pig Production – 2019. Global Challenges 2020: will we be able to find the answers?” (Moscow, December 3–5, 2019)*. М., 2019. (in Russian)

7. La Russie devient exportatrice de porc. *Porcmap*. 2019; 545: 8. Available at: <https://boutique.editionsduboisbaudry.com/porcmap/979-septembre-2019.html>.

Поступила 10.01.20

Принята в печать 21.02.20

Received on 10.01.20

Approved for publication on 21.02.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Груздев Константин Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Иголкин Алексей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Konstantin N. Gruzdev, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher of Information and Analysis Centre, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Anton K. Karaulov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Information and Analysis Centre, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Alexey S. Igolkin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of ASF Reference Laboratory, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Гетерогенность вирусной популяции при инфекционном бронхите кур

Е. В. Овчинникова¹, Л. О. Щербакова², С. Н. Колосов³, А. Н. Андриясова⁴, Н. Г. Зиняков⁵,
З. Б. Никонова⁶, А. А. Козлов⁷, П. Б. Акшалова⁸, Д. А. Алтунин⁹, Д. Б. Андрейчук¹⁰

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0001-5501-4432, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-5434-6179, e-mail: scherbakova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-8467-180X, e-mail: kolosov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5335-3534, e-mail: andriyasova_an@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-3015-5594, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0003-0090-9399, e-mail: nikonova@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-1466-7602, e-mail: kozlov_aa@arriah.ru

⁸ ORCID 0000-0003-1520-1887, e-mail: akshalova@arriah.ru

⁹ ORCID 0000-0002-7510-9292, e-mail: altunin@arriah.ru

¹⁰ ORCID 0000-0002-1681-5795, e-mail: andreychuk@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Инфекционный бронхит кур является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций, наносящих огромный экономический ущерб птицеводству во всем мире. По причине отсутствия механизмов коррекции во время репликации генома вирус может быстро мутировать и генерировать новые штаммы. Этому способствует широкое использование живых вакцин, одновременная циркуляция полевых вирусов, относящихся к разным серотипам в одном стаде, и быстрое распространение вируса. Проведенные ранее исследования выявленных на птицефабриках Российской Федерации штаммов и изолятов вируса инфекционного бронхита кур показали, что 50% положительных проб относятся к вакцинным штаммам 4-91, D274, H-120, Ma5, вторая половина положительных проб представлена полевыми вирусами, которые относятся к 8 генетическим линиям генотипа GI, при этом доминирующей является линия G1-19 (QX). В данной работе представлены результаты по выявлению и генотипированию вируса инфекционного бронхита кур на одной из птицефабрик Саратовской области Российской Федерации в 2018–2019 гг. Внутренние органы, ротоглоточные и клоакальные смывы, кровь отбирали от цыплят и кур-несушек разных возрастов из родительского стада и стада ремонтного молодняка. Выявлены: вакцинный штамм, полевые изоляты генетической линии GI-19 и варианты изоляты, не относящиеся ни к одной из известных генетических линий. Анализ результатов исследований за двухлетний период показал, что важно исследовать пробы, взятые от птиц разного возраста. Инфицируя несколько поколений птиц, вирус изменяется и приспосабливается, порождая новые генетические формы, благодаря чему наблюдается гетерогенность вирусной популяции не только на птицефабрике в целом или в отдельном цехе, но и в одном организме. Выявленные изоляты обладали тропизмом к тканям кишечника, репродуктивных органов и, в единичных случаях, трахеи и легких. Полученные данные свидетельствуют о том, что на птицефабрике, несмотря на применяемую вакцинацию, циркулирует генетически разнородная популяция вируса инфекционного бронхита, при этом инфекция может не проявляться в раннем возрасте, но может повлиять на продуктивность стада в дальнейшем за счет патологических изменений органов репродукции кур-несушек.

Ключевые слова: вирус инфекционного бронхита кур, генетический анализ, генетическая линия, гетерогенность вирусной популяции.

Для цитирования: Овчинникова Е. В., Щербакова Л. О., Колосов С. Н., Андриясова А. Н., Зиняков Н. Г., Никонова З. Б., Козлов А. А., Акшалова П. Б., Алтунин Д. А., Андрейчук Д. Б. Гетерогенность вирусной популяции при инфекционном бронхите кур. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 44–50. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-44-50.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Овчинникова Евгения Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru.

Heterogeneity of avian infectious bronchitis virus population

Ye. V. Ovchinnikova¹, L. O. Scherbakova², S. N. Kolosov³, A. N. Andriyasova⁴, N. G. Zinyakov⁵,
Z. B. Nikonova⁶, A. A. Kozlov⁷, P. B. Akshalova⁸, D. A. Altunin⁹, D. B. Andreychuk¹⁰

FGBI "Federal Centre for Animal Health", Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0001-5501-4432, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-5434-6179, e-mail: scherbakova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-8467-180X, e-mail: kolosov@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5335-3534, e-mail: andriyasova_an@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-3015-5594, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0003-0090-9399, e-mail: nikonova@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-1466-7602, e-mail: kozlov_aa@arriah.ru

⁸ ORCID 0000-0003-1520-1887, e-mail: akshalova@arriah.ru

⁹ ORCID 0000-0002-7510-9292, e-mail: altunin@arriah.ru

¹⁰ ORCID 0000-0002-1681-5795, e-mail: andreychuk@arriah.ru

SUMMARY

Avian infectious bronchitis is one of the most common viral infections causing enormous economic losses in the global poultry industry. Due to the lack of mechanisms to correct errors during genome replication, the virus can quickly mutate and generate new strains. This is facilitated by widespread use of live vaccines, simultaneous circulation of field viruses belonging to different serotypes in one flock and rapid spread of the virus. Previous studies of avian infectious bronchitis virus strains and isolates identified in the Russian Federation poultry farms showed that 50% of samples tested positive for the 4-91, D274, H-120, Ma5 vaccine strains, and the other half of samples tested positive for the field viruses belonging to eight GI genetic lineages, while the G1-19 (QX) lineage was dominant. The paper presents identification and genotyping results of the avian infectious bronchitis virus in one of the poultry farms in the Saratov Oblast (the Russian Federation) in 2018–2019. The samples of internal organs and blood, as well as oropharyngeal and cloacal swabs were taken from chicks and layers of different ages in the parent and replacement flocks. The vaccine strain, G1-19 field isolates and variant isolates that do not belong to any of the known genetic lineages were detected. Analysis of test results within a two-year period showed that it is important to study samples taken from birds of different ages. The virus undergoes modification and adaptation inducing new genetic forms by infecting several poultry generations, due to which the heterogeneity of the virus population is observed not only in the poultry farm as a whole or in a separate department, but also within one organism. The identified isolates showed tropism for the tissues of intestine, reproductive organs, and, in rare cases, trachea and lungs. The data obtained indicate that, despite the vaccination used, a genetically diverse population of the infectious bronchitis virus circulates in the poultry farm, while the infection may not manifest itself at an early age, but may affect the flock productivity in the future due to pathological changes in the reproductive organs of laying chickens.

Key words: avian infectious bronchitis virus, genetic analysis, genetic lineage, virus population heterogeneity.

For citation: Ovchinnikova Ye. V., Scherbakova L. O., Kolosov S. N., Andriysova A. N., Zinyakov N. G., Nikonova Z. B., Kozlov A. A., Akshalova P. B., Altunin D. A., Andreychuk D. B. Heterogeneity of avian infectious bronchitis virus population. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 44–50. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-44-50.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Yevgenia V. Ovchinnikova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: ovchinnikova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный бронхит кур (ИБК) является одной из наиболее важных вирусных инфекций, которые наносят огромный экономический ущерб птицеводству во всем мире. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус порядка *Nidovirales*, семейства *Coronaviridae*, рода *Coronavirus*, который может быстро мутировать по причине отсутствия механизмов коррекции во время репликации генома, т. е. способен генерировать новые штаммы вируса.

Профилактика ИБК, наряду с надлежащими мерами биобезопасности, опирается на рутинную вакцинацию. Однако этому подходу препятствует высокая генетическая изменчивость вируса, приводящая к постоянному появлению новых вариантов, против которых перекрестной защиты может не быть. Защита против определенного варианта может быть достигнута путем применения либо одной вакцины на основе штамма того же генотипа вируса (гомологичная вакцинация), либо нескольких вакцин на основе различных линий, чтобы расширить спектр защиты (гетерологичная вакцинация) [1, 2]. Для этого применяют множество вакцин и схем иммунизации. Однако до сих пор существуют трудности в подборе комбинации аттенуированных гетерологичных вакцинных штаммов вируса, которые обеспечили бы эффективную защиту птицы от заболевания. Несмотря на важное значение для контроля заболевания, широкое использование вакцин против ИБК имеет некоторые существенные недостатки. Живые ат-

тенуированные вакцинные штаммы могут распространяться на непривитые стада, восстанавливать вирулентность, а также становиться участниками естественной рекомбинации. Кроме того, их применение осложняет диагностику ИБК, так как многие выявляемые полевые вирусы близкородственны вакцинным штаммам.

Анализ выявленных на птицефабриках Российской Федерации штаммов и изолятов вируса ИБК показал, что примерно 50% положительных проб относятся к вакцинным штаммам 4-91, D274, H-120, Ma5. Вторая половина положительных проб представлена полевыми вирусами ИБК, которые относятся к 8 генетическим линиям генотипа GI: GI-1 (Macc), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-14 (B1648), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-22, GI-23 (Variant-2). Кроме того, на птицефабриках РФ были выявлены изоляты, являющиеся природными рекомбинантами, и варианты изоляты, не относящиеся ни к одному из известных генотипов. Доминирующей группой является генетическая линия G1-19 (QX) [3].

Клинические проявления ИБК зависят от ряда факторов, в том числе от вирулентности и тропизма вируса. Воратами инфекции являются дыхательные пути, затем вирус ИБК распространяется системно, заражая эпителиальные клетки во многих тканях. Степень выраженности клинических признаков зависит от штамма вируса и условий содержания птицы, таких как микроклимат в птичнике, пыль, плотность посадки, возраст и тип птицы, ее иммунный статус (вакцинация, иммунная супрессия, наличие материнских антител),

наличие сопутствующих инфекций также является важным фактором. Смертность из-за одного только ИБК обычно очень низка, но может быть выше после вторичных бактериальных инфекций [4].

Полевые изоляты генетической линии GI-19 (QX) обладают тропизмом к эпителиальным клеткам практически всех систем органов, тем самым вызывая все возможные синдромы инфекционного бронхита кур. Исследователи описывают вирусы данной генетической линии как респираторные, нефропатогенные, поражающие органы репродукции, также есть сведения о полевых штаммах, вызывающих поражения желудочно-кишечного тракта [5, 6]. Большинство полевых изолятов вируса ИБК были выделены и описаны во время вспышек с острым течением заболевания. Однако известны случаи выявления вируса ИБК генетической линии GI-19 при бессимптомном протекании инфекции или с легкими респираторными расстройствами [7].

Целью данной работы было исследование биологического материала от птиц разных возрастов, содержащихся в разных цехах одной отдельно взятой птицефабрики, на наличие генома вируса ИБК с последующим филогенетическим анализом полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена S1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы биологического материала от птиц были исследованы с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в соответствии с методическими указаниями [8, 9].

Для генотипирования вируса ИБК использовали сравнительный анализ фрагмента гена S1 примерно 500 н. о. (позиция 112–653 н. о. на гене S относительно штамма H120). Для анализа использовали нуклеотидные последовательности прототипных штаммов, предложенных V. Valastro et al. [10].

Определение нуклеотидной последовательности осуществляли по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно-меченых терминирующих нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя.

Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями штаммов вируса ИБК, опубликованными в международной базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3.

Специфические антитела к ИБК в сыворотках крови выявляли с использованием «Набора для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» в соответствии с инструкцией. Учет реакции проводили на спектрофотометре-ридере Тесап (Австрия) при длине волны 405 нм с использованием компьютерной программы «СИНКО-ИФА». Результат реакции считали положительным при величине титра антител 725 и выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ФГБУ «ВНИИЗЖ», с целью исследования на наличие генетического материала вируса ИБК, с одной из птицефабрик Саратовской области была доставлена живая птица: 9 голов ремонтного молодняка и 12 голов кур-несушек родительского стада (табл. 1).

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

Во время внешнего осмотра живых птиц в возрасте от 19 до 290 сут, поступивших в декабре 2018 г., и патологоанатомического вскрытия никаких отклонений от нормы выявлено не было. При вскрытии кур в возрасте 361 сут, доставленных в октябре 2019 г., наблюдали наличие множественных кист органов репродукции с водянистым содержимым объемом более 100 мл.

Для исследования методом ПЦР от каждой особи были взяты ротоглоточные, клоакальные смывы и пробы тканей внутренних органов (трахея, легкие, почки, кишечник, репродуктивные органы). На первом этапе работы исследовали пробы тканей внутренних органов птиц, объединенные внутри каждой группы, т. е. 8 проб (табл. 1). Отрицательной в ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ была объединенная проба № 1 от 19-суточных цыплят из цеха № 4, несмотря на то что вся птица была вакцинирована в суточном возрасте двухкомпонентной вакциной из штаммов H120 и D274 и в 12–14-суточном возрасте вакциной из штамма 4-91 согласно инструкциям производителей. В остальных объединенных пробах (№ 2–8) выявлен геном вируса ИБК (табл. 2). Аналогичные результаты были получены и в результате исследования сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА), когда специфические антитела к вирусу ИБК выявляли у птиц всех групп, кроме первой (табл. 3).

В пробе № 4 выявлен дериват вакцины 4-91 IBV45-18 (нуклеотидная последовательность фрагмента гена S1 имела 99% гомологии с вакцинным штаммом и отличалась от него по 4 н. о.). В научной литературе есть данные о том, что проведение пассажей вакцинных штаммов вируса на живой птице и куриных эмбрионах иногда приводит к единичным нуклеотидным и аминокислотным заменам. Интересно, что один и тот же вакцинный штамм вируса, используемый для производства вакцин разных серий одного или нескольких производителей, мутирует после пассажей по-разному.

Таблица 1
Характеристика поступившей для исследования птицы

Table 1
Characteristics of poultry received for testing

Дата поступления	Номер группы	Птица	Номер цеха	Возраст, сут
12.2018 г.	1	Ремонтный молодняк (по 3 головы от каждого цеха)	4	19
	2		7	60
	3		1	124
	4	Куры-несушки родительского стада кросса Росс ПМЗ (по 2 головы от каждого цеха)	21	192
	5		7	228
	6		15	290
10.2019 г.	7	Куры-несушки родительского стада кросса Росс ПМЗ (по 3 головы от каждого цеха)	1	361
	8		18	361

Эти отличия могут свидетельствовать о разных источниках оригинального вирусного штамма, полученного для производства этой вакцины, а также методах и количестве пассажей вируса, проводившихся для его аттенуации [11].

В остальных положительных пробах выявлены полевые вирусы: три отличающихся по первичной структуре фрагмента гена S1 изолята генетической линии GI-19 (IBV42-18, IBV43-18, IBV44-19) и два вариантных изолята с уникальной первичной структурой (IBV44-18, IBV43-19), не относящихся к какой-либо генетической линии (табл. 2, рис. 1).

При филогенетическом анализе изолят IBV44-19 линии GI-19, выявленный в 2019 г., образовывал отдельную ветвь, отличаясь по аминокислотному составу от выявленных в 2018 г. изолятов IBV42-18 и IBV43-18 на 7,5 и 10,3% соответственно. Тогда как между собой изоляты IBV42-18 и IBV43-18 отличались лишь на 2,7% (рис. 2) и были обнаружены у птиц в возрасте 60, 124 и 290 сут, причем в группе № 3 (124 сут) была выявлена смесь этих двух изолятов.

В пробах № 5 и 7 выявлены вариантные изоляты IBV44-18 и IBV43-19 вируса ИБК с уникальной структурой и не относящиеся к какой-либо генетической линии. Данные изоляты имели отличия по аминокислотному составу на 13,7%. Ранее, в марте 2018 г., на этой птицефабрике в материале от кур-несушек из разных цехов в возрасте 359 и 285 сут были идентифицированы другие два сходных между собой вариантных изолята (IBV08-18 и IBV09-18). Они отличались от изолятов IBV44-18 и IBV43-19 по аминокислотному составу на 10,3%, что свидетельствует об их разном происхождении (рис. 1, 3). Вариантные изоляты являются результатом накопления мутаций (точечных замен, делеций, инсерций и рекомбинаций), которые возникают из-за ошибок репликации вируса ИБК. Вариантный изолят может оказаться нежизнеспособным, а может длительное время циркулировать в хозяйстве, продолжая изменяться.

На следующем этапе работы определяли тропизм вируса. Для этого от каждой птицы были взяты ротоглоточные, клоакальные смывы и пробы тканей внутренних органов, которые по отдельности были исследованы в ОТ-ПЦР-РВ (табл. 3). В общей пробе от трех 60-суточных цыплят с помощью ОТ-ПЦР и секвенирования выявлен изолят вируса ИБК генетической линии GI-19 (QX) IBV42-18. В реакции ОТ-ПЦР-РВ положительными были пробы от двух птиц, взятые из кишечника и семенников.

В третьей группе ремонтного молодняка (возраст 124 сут) с помощью ОТ-ПЦР и секвенирования выявлена смесь полевых вирусов IBV42-18 и IBV43-18 генетической линии GI-19 (QX) вируса ИБК. Взятые из каждого органа пробы и общая проба тканей органов одной из трех птиц в ОТ-ПЦР-РВ показали отрицательный результат. В биологическом материале от двух других птиц этой группы геном вируса ИБК выявлен еще в трахеях и легких птиц, в отличие от остальных возрастных групп, где положительными были только пробы тканей кишечника и репродуктивных органов. Проведено секвенирование фрагмента гена S1 вируса, выявленного в пробах, полученных из тканей трахеи и кишечника птицы № 8. Установлено, что в кишечнике персистирует полевой вирус IBV42-18, а в трахее этой же птицы выявлен вакцинный штамм 4-91.

Таблица 2
Результаты генотипирования вируса инфекционного бронхита кур

Table 2
Genotyping results of avian infectious bronchitis virus

Дата	Номер группы	Возраст птиц, сут	Генетическая принадлежность	Название изолята
12.2018 г.	2	60	GI-19	IBV42-18
	3	124	GI-19	IBV42-18 IBV43-18
	4	192	GI-13, дериват вакцинного штамма 4-91	IBV45-18
	5	228	вариантный изолят	IBV44-18
	6	290	GI-19	IBV43-18
10.2019 г.	7	361	вариантный изолят	IBV43-19
	8	361	GI-19	IBV44-19

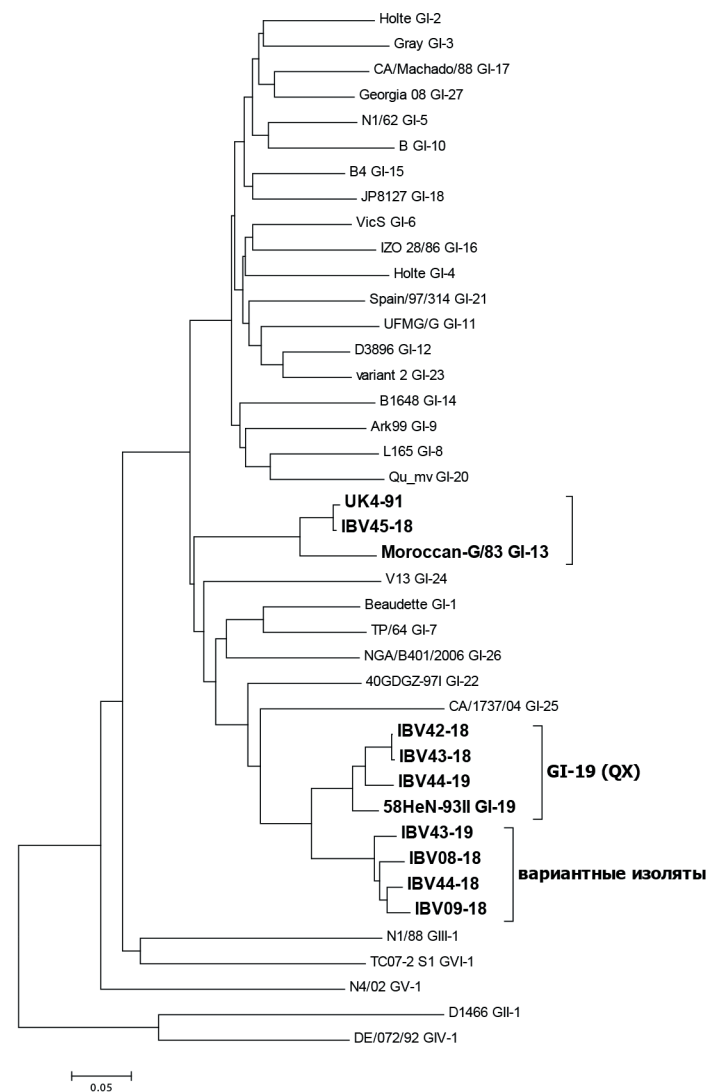


Рис. 1. Филогенетические связи на основе анализа фрагмента гена S1 изолятов вируса ИБК, выявленных на птицефабрике Саратовской области в 2018–2019 гг.

Fig. 1. Phylogenetic relationships based on analysis of the S1 gene fragment of IB virus isolates identified in a poultry farm in Saratov Oblast in 2018–2019

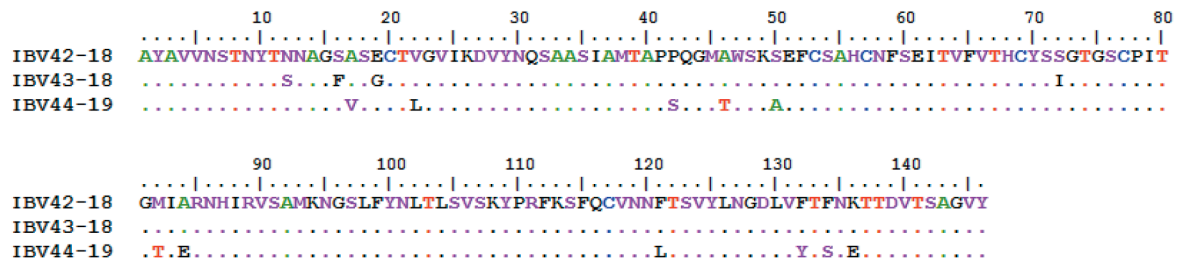


Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей выявленных изолятов генетической линии GI-19

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of identified GI-19 isolates

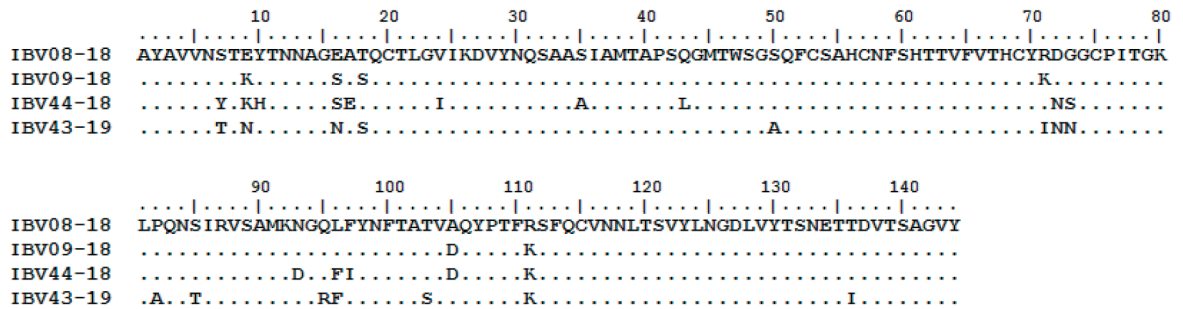


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей выявленных вариантных изолятов

Fig. 3. Comparison of amino acid sequences of identified variant isolates

В пробах тканей внутренних органов от птиц родительского стада возраста 192, 228, 290 и 361 сут методами ОТ-ПЦР и секвенирования выявлены вакцинный штамм 4-91 (IBV45-18), два вариантных изолята (IBV44-18, IBV43-19) и два полевых вируса (IBV43-18, IBV44-19) генетической линии GI-19 (QX) вируса ИБК. В ОТ-ПЦР-РВ положительными к вирусу ИБК были пробы тканей кишечника, органов репродукции и одна проба клоакального смыва (табл. 3).

Анализ результатов исследований на одной птицефабрике за двухлетний период показал, что выявляемость вируса ИБК молекулярными методами зависит от выборки проб, числа образцов, возраста птицы, исследуемых органов и т. д. Если инфекционный бронхит вызывает репродуктивный и нефропатогенный синдромы, то клинические проявления часто наблюдают спустя месяцы после инфицирования, при этом самого вируса в тканях птицы может не быть, поэтому важно исследовать пробы от птиц разного возраста. С другой стороны, в окружающей среде вирус ИБК может сохраняться длительное время. Инфицируя несколько поколений птиц, вирус изменяется и приспосабливается, порождая новые генетические формы, благодаря чему наблюдается гетерогенность вирусной популяции не только на птицефабрике в целом или в отдельном цехе, но и в одном организме. Даже у одной птицы вирус может быть представлен в виде набора вирионов, содержащих как слегка измененные, но близкородственные геномы, так и геномы, принадлежащие к разным генетическим линиям, что способствует быстрой адаптации и выживанию вируса в организме хозяина. Кроме того, разнообразие вируса на одной фабрике, в частности появление новых изолятов с высоким процентом аминокислотных отличий (8–10% и выше), свидетельствует о притоке патогена извне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных на одной из птицефабрик Саратовской области РФ в 2018–2019 гг. Показана гетерогенность вирусной популяции в родительском стаде кур-несушек и стаде ремонтного молодняка, где кроме применяемого вакцинного штамма выявлены три полевых вируса генетической линии GI-19 и два вариантных изолята, не относящихся ни к одной из известных генетических линий. Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на применяемую вакцинацию, на птицефабрике циркулирует генетически разнородная популяция вируса ИБК, которая может не проявляться в раннем возрасте, но может влиять на продуктивность стада за счет патологических изменений органов репродукции кур-несушек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 2, 4–6, 10, 11 см. REFERENCES)

3. Щербакова Л. О., Колосов С. Н., Никонова З. Б., Зиняков Н. Г., Овчинникова Е. В., Чвала И. А. Генетическая характеристика изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных на территории стран СНГ в 2015–2017 гг. *Ветеринария сегодня*. 2018; 3: 30–39. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-3-26-30-34.
7. Овчинникова Е. В., Зиняков Н. Г., Беляков С. В., Дрыгин В. В. Вирус инфекционного бронхита кур генотипа QX. Изучение молекулярно-биологических и патогенных свойств. *IV Международный ветеринарный конгресс: материалы конф. «Актуальные ветеринарные проблемы в промышленном птицеводстве»*. Казань; 2014.
8. Бочков Ю. А., Дрыгин В. В., Борисов А. В., Гусев А. А., Смоленский В. И. Индикация генома вируса инфекционного бронхита кур с помощью полимеразной цепной реакции. *Современные аспекты ветеринарной патологии животных: материалы конф. (23–25 ноября 1998 г.)*. Владимир; 1998: 173–183.
9. Овчинникова Е. В., Щербакова Л. О., Андриясов А. В., Борисов А. В., Мудрак Н. С. Методические указания по выявлению генома вируса ин-

Таблица 3

Результаты исследований проб тканей внутренних органов птиц разных возрастов на наличие вируса ИБК

Table 3

Test results for tissue samples of internal organs from birds of different ages for presence of avian infectious bronchitis virus

Номер и возраст птицы			Титр антител	Результат ОТ-ПЦР-РВ, сг							
				общая проба органов	трахея	легкие	почки	кишечник	яйцевод/семенники*	ротоглот. смывы	клоак. смывы
1	Ремонтный молодняк	19	отр.	отр.	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	отр.	отр.
2			отр.	отр.	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	отр.	отр.
3			отр.	отр.	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	отр.	отр.
4		60	3220	33,9	отр.	отр.	отр.	32,0	отр.	отр.	отр.
5			сомнит.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
6			2474	35,7	отр.	отр.	отр.	36,6	35,0*	отр.	отр.
7		124	3600	33,7	35,6	39,8	отр.	30,3	отр.	отр.	отр.
8			5012	34,7	38,5	отр.	отр.	34,7	отр.	отр.	отр.
9			3373	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
10	Родительское стадо	192	н/и	34,5	отр.	отр.	отр.	29,9	отр.	отр.	отр.
11			7542	34,4	отр.	отр.	отр.	31,8	38,5	отр.	отр.
12		228	4925	34,4	отр.	отр.	отр.	32,2	отр.	отр.	отр.
13			5857	35,2	отр.	отр.	отр.	32,3	36,7	отр.	38,4
14		290	3341	33,8	отр.	отр.	отр.	30,5	39,7	отр.	отр.
15			2602	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
16		361	2894	н/и	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
17			5454	37,9	отр.	отр.	отр.	37,6	отр.	отр.	отр.
18			3828	н/и	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
19			7916	36,2	отр.	отр.	отр.	34,1	отр.	отр.	отр.
20			4609	н/и	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.
21			2931	н/и	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.

отр. — отрицательный результат;

сомнит. — сомнительный результат;

н/и — не исследовали.

фекционного бронхита кур с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 05.02.2010. Владимир; 2010; 10 с.

REFERENCES

1. Sjaak de Wit J. J., Cook J. K., van der Heijden H. M. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 2011; 40 (3): 223–235. DOI: 10.1080/03079457.2011.566260.
2. Bande F., Arshad S. S., Bejo M. H., Moeini H., Omar A. R. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015:424860. DOI: 10.1155/2015/424860.
3. Scherbakova L. O., Kolosov S. N., Nikonova Z. B., Zinyakov N. G., Ovchinnikova Ye. V., Chvala I. A. Genetic characterization of avian infectious bronchitis virus isolates recovered in CIS countries in 2015–2017. *Veterinary Science Today.* 2018; 3: 30–39. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-3-26-30-34. (in Russian)
4. Jackwood M. W., de Wit S. Infectious bronchitis. In: Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D. L., Nair V. (eds.). *Diseases of Poultry*. 13th ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, 2013; 139–160.

5. Bande F., Arshad S. S., Omar A. R., Bejo M. H., Abubakar M. S., Abba Y. Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. *Adv. Virol.* 2016; 2016:4621659. DOI: 10.1155/2016/4621659.
6. Terregino C., Toffan A., Beato M. S., De Nardi R., Vascellari M., Meini A., Ortali G., Mancin M., Capua I. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the MA5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 2008; 37 (5): 487–493. DOI: 10.1080/03079450802356938.
7. Ovchinnikova Ye. V., Zinyakov N. G., Belyakov S. V., Drygin V. V. QX genotype avian infectious bronchitis virus. Study of molecular, biological and pathogenic properties [Virus infekcionnogo bronhita kur genotipa QX. Izuchenie molekulyarno-biologicheskikh i patogennykh svoystv]. *IV International Veterinary Congress: conference proceedings "Current veterinary issues in poultry industry"*. Kazan; 2014. (in Russian)
8. Bochkov Yu. A., Drygin V. V., Borisov A. V., Gusev A. A., Smolenskiy V. I. Indication of avian infectious bronchitis virus genome using polymerase chain reaction [Indikatsiya genoma virusa infekcionnogo bronhita kur s pomoshch'yu polimeraznoj cepnoj reakcii]. *Current issues in veterinary pathology: conference proceedings [Sovremennye aspekty veterinarnoy patologii zhivotnykh] (November 23–25, 1998)*. Vladimir; 1998: 173–183. (in Russian)

9. Ovchinnikova Ye. V., Scherbakova L. O., Andriyasov A. V., Borisov A. V., Mudrak N. S. Guidelines for identification of avian infectious bronchitis virus genome using real-time polymerase chain reaction [Metodicheskie ukazaniya po vyavleniyu genoma virusa infekcionnogo bronhita kur s ispol'zovaniem polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni]: approved by FGBI "ARRIAH" 05.02.2010. Vladimir; 2010; 10 p. (in Russian)

10. Valastro V., Holmes E. C., Britton P., Fusaro A., Jackwood M. W., Catoli G., Monne I. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 349–364. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.015.

11. McKinley E. T., Hilt D. A., Jackwood M. W. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine.* 2008; 26 (10): 1274–1284. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.01.006.

Поступила 17.12.19

Принята в печать 03.02.20

Received on 17.12.19

Approved for publication on 03.02.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Овчинникова Евгения Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Щербакова Лидия Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Колосов Сергей Николаевич, кандидат биологических наук, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андриясова Анна Николаевна, ведущий биолог референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Зиняков Николай Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Никонова Зоя Борисовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Козлов Антон Александрович, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Акшалова Перизат Батырханкызы, аспирант, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Алтунин Дмитрий Александрович, ведущий биолог референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Yevgeniya V. Ovchinnikova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Lidia O. Scherbakova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Sergey N. Kolosov, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anna N. Andriyasova, Leading Biologist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Nikolay G. Zinyakov, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Zoya B. Nikonova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Anton A. Kozlov, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Perizat B. Akshalova, Post-Graduate Student, Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry A. Altunin, Leading Biologist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Характеристика микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения в Российской Федерации за период с 2015 по 2018 год

И. В. Бородкина¹, Н. Б. Шадрова², О. В. Прунтова³, О. И. Ручнова⁴, Е. С. Ерофеева⁵, С. И. Данильченко⁶, С. Г. Ерофеев⁷

^{1,5,6,7} Филиал ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в Республике Крым, г. Симферополь, Россия

^{2,3,4} ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0002-5324-7678, e-mail: borodkina@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-7510-1269, e-mail: shadrova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5663-8009, e-mail: ruchnova@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0001-5060-6105, e-mail: erofeeva@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-7796-7349, e-mail: danyilchenko@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-4332-5337, e-mail: erofeev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

На сегодняшний день в Российской Федерации сложилась целая система нормативно-правовых документов, регулирующих вопросы обеспечения продовольственной безопасности. Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов осуществляется на федеральном уровне, уровне субъектов Российской Федерации, уровне муниципальных образований на основе разработанных и утвержденных в установленном порядке нормативных и методических документов. В статье представлен анализ данных информационной системы «Ассоль» по микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения, полученных при выполнении государственных работ «Проведение лабораторных исследований в рамках плана государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов» и «Проведение лабораторных исследований сырья, продукции животного происхождения, кормов и биологического материала в целях обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов». Данные по микробиологическим показателям были получены в 37 подведомственных Россельхознадзору лабораториях Российской Федерации за период с 2015 по 2018 г. На основании выполненного анализа установлено, что максимальное количество исследований приходилось на обнаружение патогенных микроорганизмов: бактерий рода *Salmonella* (29,5% при проведении государственного мониторинга и 26,8% при выполнении государственного задания) и *Listeria monocytogenes* (22 и 21% соответственно). Наибольшее количество несоответствий при проведении мониторинга установлено по показателям КМАФАнМ (количество мезофильных анаэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов – 14,8%) и БГКП (бактерии группы кишечной палочки – 8,98%); при выполнении государственного задания – по показателям дрожжи (18,8%), дрожжи и плесневые грибы (18,5%) и КМАФАнМ (12,4%). Определены показатели, процент выявления которых при выполнении государственных работ составил менее 1. Это паразитический вибрион, бактерии рода *Proteus* и сульфитредуцирующие клостридии. Обоснована необходимость дальнейших исследований по оценке безопасности и качества сырья и продукции животного происхождения на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: сырье и продукция животного происхождения, микробиологические показатели безопасности, государственный мониторинг, риск-ориентированный подход.

Для цитирования: Бородкина И. В., Шадрова Н. Б., Прунтова О. В., Ручнова О. И., Ерофеева Е. С., Данильченко С. И., Ерофеев С. Г. Характеристика микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения в Российской Федерации за период с 2015 по 2018 год. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 51–59. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-51-59.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Бородкина Инна Валериевна, аспирант, руководитель сектора приема проб пищевой продукции и оформления документации Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, 295494, Россия, г. Симферополь, пос. Комсомольское, ул. Шоссейная, 21А, e-mail: borodkina@arriah.ru.

Characteristics of microbial contamination of animal raw materials and products in the Russian Federation from 2015 to 2018

I. V. Borodkina¹, N. B. Shadrova², O. V. Pruntova³, O. I. Ruchnova⁴, Ye. S. Yerofeeva⁵, S. I. Danilchenko⁶, S. G. Yerofeev⁷

^{1,5,6,7} Branch of FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH") in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia

^{2,3,4} FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-5324-7678, e-mail: borodkina@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-7510-1269, e-mail: shadrova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5663-8009, e-mail: ruchnova@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0001-5060-6105, e-mail: erofeeva@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-7796-7349, e-mail: danylchenko@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-4332-5337, e-mail: erofeev@arriah.ru

SUMMARY

To date, there is a whole system of legal documents, regulating food security issues in the Russian Federation. Monitoring of food quality and safety is performed on the federal level, on the level of the Russian Federation Subjects and on the municipal level based on the developed and adopted regulatory and methodical documents. The paper presents the analysis of ASSOL information system data related to microbial contamination of animal raw materials and products, collected within the following official activities: "Laboratory Testing within Official Monitoring of Food Safety and Quality" and "Laboratory Testing of Animal Raw Materials and Products, Feed and Biological Materials for the Purposes of Food Safety and Quality Assurance". Microbiological test data were obtained from 37 Russian laboratories, subordinate to the Rosselkhoz nadzor, within 2015–2018. The analysis performed showed that the maximum number of tests was performed for the following pathogenic microorganisms: *Salmonella* bacteria (29.5% within official monitoring and 26.8% within official programme). The highest number of non-compliances within monitoring was revealed when testing for total viable count (total mesophilic anaerobic and facultative anaerobic microorganisms) – 14.8% and Coliforms – 8.98%; within the official programme most violations were related to yeast (18.8%), yeasts and molds (18.5%) and TVC (12.4%). The parameters, showing less than 1% of positives within official programme testing, were identified. They include *Vibrio parahaemolyticus*, *Proteus* bacteria and sulphite-reducing clostridia. The necessity in further tests for safety and quality of animal raw materials and products in the Russian Federation was justified.

Key words: animal raw materials and products, microbiological parameters of safety, official monitoring, risk-oriented approach.

For citation: Borodkina I. V., Shadrova N. B., Pruntova O. V., Ruchnova O. I., Yerofeeva Ye. S., Danilchenko S. I., Yerofeev S. G. Characteristics of microbial contamination of animal raw materials and products in the Russian Federation from 2015 to 2018. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 51–59. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-51-59.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Inna V. Borodkina, Post-Graduate Student, Head of the Unit of Food Sample Reception under the FGBI "ARRIAH" in the Republic of Crimea, 295494, Russia, Simferopol city, set. of Komsomolskoye, st. Shosseynaya, 21A, e-mail: borodkina@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в Российской Федерации сформирована и функционирует система нормативно-го и правового регулирования в области обеспечения безопасности сырья и пищевой продукции животного происхождения. Для гарантии ветеринарной и ветеринарно-санитарной безопасности предусмотрен ряд законодательных актов, в частности Закон РФ «О ветеринарии» № 4979-1, федеральные законы «О качестве и безопасности пищевых продуктов» № 29-ФЗ и «О техническом регулировании» № 184-ФЗ [1, 2].

Основными документами, регламентирующими процессы производства (изготовления), хранения, перевозки (транспортирования), реализации и утилизации пищевой продукции, являются технические регламенты Таможенного союза 021/2011, 033/2013, 034/2013 и Евразийского экономического союза 040/2016 [1, 2].

Согласно ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» на предприятиях при осуществлении процессов производства пищевой продукции изготовитель должен разработать, внедрить и поддерживать процедуры, основанные на принципах ХАССП [2].

Основные положения концепции ХАССП сформулированы в директивах Совета Европейского сообщества. Принципы ХАССП рекомендованы к практическому применению Комиссией Codex Alimentarius и являются обязательными для стран Евросоюза (ЕС) [3, 4].

Актуальность реализации на практике принципов ХАССП признается во всех странах мира, однако уровень внедрения данной концепции в них существенно

варьирует. Так, если в странах ЕС реализация принципов ХАССП является обязательным условием для любого предприятия, то в РФ реализация этих принципов далека от совершенства [3, 4, 5, 6].

Согласно Директиве Совета № 96/23/ЕС от 29.04.1996 «О мерах по мониторингу определенных веществ и их остатков в живых животных и продуктах животного происхождения» лабораторные исследования проводятся по двум основным группам: А – вещества, имеющие анаболический эффект и не разрешенные к применению, и В – ветеринарные препараты и загрязнители. Микробиологические показатели не входят в критерии мониторинга продукции животного происхождения в связи с высоким уровнем развития системы ХАССП в странах ЕС и высокой долей ответственности производителей за безопасность выпускаемой ими продукции животного происхождения [6].

Как было сказано выше, в настоящее время уровень внедрения системы ХАССП в Российской Федерации не достиг должного уровня [3, 4, 5]. В связи с этим для обеспечения выполнения требований Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер (ВТО) приказом Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) микробиологические критерии безопасности были включены в план государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов.

С 2007 г. реализация плана пищевого мониторинга на территории Российской Федерации осуществляется Россельхознадзором.

Целью данной работы является анализ данных информационной системы «Ассоль» по микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения, полученных при выполнении государственных работ «Проведение лабораторных исследований в рамках плана государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов» (далее – «Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов») и «Проведение лабораторных исследований сырья, продукции животного происхождения, кормов и биологического материала в целях обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов» (далее – «Безопасность пищевой продукции») в период с 2015 по 2018 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с «Положением о мониторинге качества, безопасности пищевых продуктов и здоровья населения», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 22.11.2000 № 883, мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов осуществляется на федеральном уровне, уровне субъектов Российской Федерации, уровне муниципальных образований на основе разработанных и утвержденных в установленном порядке нормативных и методических документов [2].

Объектом анализа были выбраны данные информационной системы «Ассоль» за 2015–2018 гг. о выполнении государственных работ («Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов» и «Безопасность пищевой продукции») по 37 подведомственным Россельхознадзору лабораториям Российской Федерации. Учитывали микробиологические критерии безопасности и качества.

При построении диаграмм был использован табличный редактор Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация государственной работы «Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов» и государственного эпизоотологического мониторинга в части микробиологических исследований в 2015–2018 гг.

В соответствии с приказами Россельхознадзора № 831 от 31.12.2014, № 993 от 31.12.2015, № 995 от 30.12.2016, № 1304 от 28.12.2017 «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО» был утвержден план государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов.

За период с 2015 по 2018 г. было выполнено 131 545 микробиологических исследований. Данные представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, максимальное количество исследований приходится на выявление патогенных микроорганизмов – бактерий рода *Salmonella* (29,5% от общего числа исследований) и *L. monocytogenes* (22%). Далее в порядке убывания количества следуют санитарно-показательные микроорганизмы – КМАФАнМ (20,1%) и БГКП (15,6%). Исследования по обнаружению золотистого стафилококка составляют 4% от общего числа исследований. Незначительное количество исследований приходится на обнаружение сульфитредуцирующих клостридий (0,6%), бактерий рода *Proteus* (0,5%) и паразитического вибриона (0,4%).

Следует отметить, что показатели порчи продукции – дрожжи и плесневые грибы – не были включены в план государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов.

В таблице 1 также представлено количество положительных исследований, то есть количество выявлений данных микроорганизмов. Так, на первом месте стоят КМАФАнМ (14,8%), соматические клетки (9,2%) и БГКП (9,0%), что свидетельствует о неудовлетворительном санитарном состоянии предприятий по производству сырья и продукции животного происхождения в Российской Федерации.

L. monocytogenes были выделены в 4,2% исследуемых образцов, бактерии рода *Salmonella* – в 1,8%.

Уровень обнаружения золотистого стафилококка составил 0,9%, сульфитредуцирующих клостридий – 0,6%, бактерий рода *Proteus* – 0,6%. Паразитарный вибрион выделен не был.

В кормах животного происхождения несоответствия по таким показателям, как энтеропатогенные типы *E. coli* и общая бактериальная обсемененность, составили 5,7 и 4,1% соответственно, что может свидетельствовать о технологических нарушениях в процессе производства и хранения кормов.

На рисунке 1 представлены данные по выявлению микроорганизмов по годам.

Уровень обнаружения золотистого стафилококка находился в пределах 0,6–1,0%, бактерий рода *Salmonella* – 1,7–2,3% и БГКП – 8,5–9,1%. Сульфитредуцирующие клостридии были обнаружены в 2015, 2017 и 2018 гг., превышение уровня соматических клеток в молочном сырье было отмечено в 2016, 2017 и 2018 гг., а бактерии рода *Proteus* были выделены лишь в 2016 г. Можно отметить положительную динамику в сторону снижения количества несоответствий по показателю общей бактериальной обсемененности в кормах животного происхождения с 8% в 2015 г. до 1,3% в 2018 г. Уровень выявления несоответствий по показателю КМАФАнМ в продукции животного происхождения в период с 2015 по 2016 г. находился в пределах 13,2–13,3%, к 2017 г. он вырос до 17,4%. В 2018 г. количество несоответствий по показателю КМАФАнМ снизилось на 0,9% и составило 16,5%.

При анализе данных мониторинговых исследований наблюдали тенденцию к увеличению количества выявлений патогенных *L. monocytogenes* с 3,5% в 2015 г. до 4,9% в 2018 г. По нашему мнению, данная ситуация может быть вызвана способностью *L. monocytogenes* образовывать биопленки, в результате чего возрастает риск вторичной контаминации продукции животного происхождения.

В 2015–2018 гг. в соответствии с приказами Россельхознадзора были проведены лабораторные исследования в рамках государственного эпизоотологического мониторинга.

Данные об обнаружении возбудителей сальмонеллезов, листериоза и кампилобактериоза животных представлены в таблице 2.

Согласно данным, представленным в таблице 2, было выполнено 36 160 исследований по выявлению бактерий рода *Salmonella*. Процент выделения составил 1,5.

За анализируемый период из патологического материала от животных *L. monocytogenes* были выделены только в двух случаях (0,03%). Следует отметить, что

Таблица 1

Характеристика микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения, выявленной при реализации государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов в 2015–2018 гг.

Table 1

Characteristics of microbial contamination of animal raw materials and products, detected within official monitoring of food quality and safety in 2015–2018

Наименование показателя	Количество исследований по плану мониторинга	Доля в структуре микробиологических исследований, %	Количество положительных исследований	% выявления
КМАФАнМ	26 411	20,1	3901	14,8
Соматические клетки	4146	3,2	383	9,2
БГКП	20 520	15,6	1843	9,0
Энтеропатогенные типы <i>Escherichia coli</i>	3351	2,5	191	5,7
<i>Listeria monocytogenes</i>	28 958	22,0	1229	4,2
Общая бактериальная обсемененность	2129	1,6	87	4,1
Бактерии рода <i>Salmonella</i>	38 762	29,5	712	1,8
Золотистый стафилококк <i>Staphylococcus aureus</i>	5234	4,0	45	0,9
Сульфитредуцирующие бактерии рода <i>Clostridium</i>	798	0,6	5	0,6
Бактерии рода <i>Proteus</i>	731	0,5	4	0,6
Парагемолитический вибрион <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	505	0,4	0	0
Всего	131 545	100	8400	6,4

в продукции животного происхождения уровень выявления данного микроорганизма составляет 4,2% (см. табл. 1). Такая разница, по нашему мнению, может быть обусловлена рядом причин.

В первую очередь это различия в методологическом подходе при исследовании листерий. На сегодняшний день выделение *L. monocytogenes* из пищевых продуктов проводится по ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*», который предполагает двухступенчатый метод обогащения образца. Исследование патологического материала проводится в соответствии с «Методическими рекомендациями по лабораторной диагностике листериоза животных и людей» (утв. Минздравом СССР 04.09.1986 и Госагропромом СССР 13.02.1987). Согласно данным методическим рекомендациям при бактериологическом исследовании предварительно готовят суспензию из головного мозга и паренхиматозных органов на физиологическом растворе в соотношении один к пяти, которой инокулируют мясопептонный бульон или бульон Хоттингера с последующим пересевом на печеночный агар или кровяной агар, или агар с теллуритом калия.

Во-вторых, причиной загрязнения продукции животного происхождения может являться вторичная контаминация сырья при несоблюдении технологических процессов его производства и переработки.

Третьей возможной причиной, затрудняющей бактериологическую диагностику листериоза в патологическом материале, может выступать сопутствующая микрофлора, способная подавить жизнедеятельность листерий.

Исследования по выявлению бактерий рода *Campylobacter*, проведенные в 2015–2018 гг., показали, что процент выделения данного патогена составлял 1,1.

По данным Всемирной организации здравоохранения, бактерии рода *Campylobacter* являются одной из наиболее распространенных причин острых кишечных инфекций [7, 8, 9, 10]. В то же время исследование на наличие бактерии рода *Campylobacter* в продукции животного происхождения в Российской Федерации на сегодняшний день не входит в план выполнения государственных работ.

Характеристика микробной контаминации продукции животного происхождения, выявленной при реализации государственного задания «Безопасность пищевой продукции» за период с 2016 по 2018 г.

Государственное задание по показателям безопасности продукции животного происхождения в 2015–2018 гг. было выполнено на основании приказов Россельхознадзора № 790 от 26.12.2014, № 915 от 17.12.2015, № 081-00037-16-00 от 29.12.2015, № 081-00032-17-00 от 30.12.2016, № 081-00015-18-00 от 29.12.2017. Данные по микробиологическим показателям представлены в системе «Асоль» начиная с 2016 г.

Результаты выполнения государственного задания по микробиологическим показателям безопасности за период с 2016 по 2018 г. отражены в таблице 3.

Всего за три года было проведено 117 001 исследование, выявлено 6686 несоответствий, уровень выявления по микробиологическим показателям составил 5,7%.

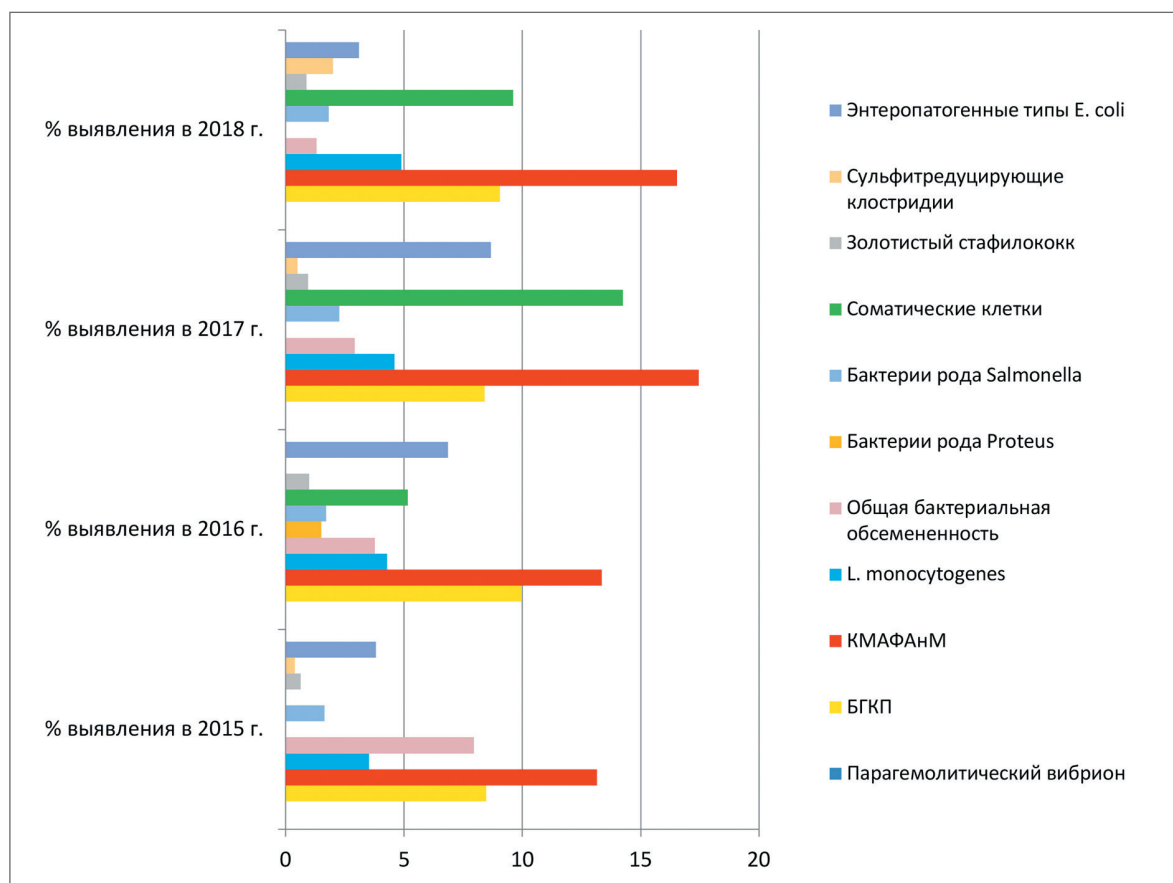


Рис. 1. Динамика выявления микробиологических контаминантов при выполнении государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов за период с 2015 по 2018 г.

Fig. 1. Microbiological contaminant detection dynamics within official monitoring of food quality and safety in 2015–2018

Распределение исследований по показателям выглядит следующим образом: максимальное количество приходится на долю патогенных микроорганизмов – бактерий рода *Salmonella* (26,8%) и *L. monocytogenes* (21,0%). За ними следуют показатели КМАФАМ (19,7%), БГКП (19,1%). Доля исследований по обнаружению золотистого стафилококка составляет 7,0%, это почти в два раза больше, чем при мониторинговых исследованиях. В государственном задании присутствуют показатели порчи: дрожжи, плесневые грибы. Их суммарная доля составляла 2,3%. Небольшое количество исследований приходится на обнаружение сульфитредуцирующих клостридий (0,9%), бактерий рода *Proteus* (0,5%), синегнойной палочки (0,1%). По исследованию кормов животного происхождения (общая бактериальная обсемененность и энтеропатогенные типы *E. coli*) было проведено 2688 испытаний, что составило 2,3%.

Наибольшее количество несоответствий было выявлено по показателям дрожжи (18,8%), дрожжи и плесневые грибы (18,5%). За ними в порядке убывания следуют молочнокислые микроорганизмы (12,8%) и КМАФАМ (12,4%), далее – плесневые грибы (8,6%), БГКП (8,5%), энтеропатогенные типы *E. coli* (6,5%), синегнойная палочка (2,9%), общая бактериальная обсемененность (1,8%), золотистый стафилококк (1,6%).

Среди патогенных микроорганизмов первое место по количеству выявлений занимала *L. monocytogenes* (3,1%). Количество обнаружений бактерий рода *Salmonella* составило 1,3%.

Таблица 2

Количество исследований на патогенные микроорганизмы при проведении эпизоотологического мониторинга в 2015–2018 гг.

Table 2

Number of tests for pathogenic microorganisms, performed in 2015–2018 within epidemic monitoring

Наименование бактерий	Количество исследований	Количество положительных исследований	% выявления
Бактерии рода <i>Salmonella</i>	36 160	546	1,5
Бактерии рода <i>Campylobacter</i>	1269	14	1,1
<i>L. monocytogenes</i>	7831	2	0,03

Количество выявленных несоответствий по показателям сульфитредуцирующие клостридии и бактерии рода *Proteus* составило 0,7 и 0,3% соответственно.

Анализируя данные, представленные на рисунке 2, необходимо отметить высокий уровень несоответствий по показателям БГКП (процент выявления колебался в пределах 8,2–8,9) и КМАФАМ (10,7–13,4) и низкий уровень выявления по показателю сульфитредуцирующие клостридии (в среднем 0,7% за анализируемый период).

Несоответствия по ряду показателей выявляли не каждый год. Так, синегнойную палочку обнаруживали в 2016 г. (3% выявлений) и 2017 г. (2,7%), бактерии рода *Proteus* выявляли только в 2016 г. (0,6%). Несоответствия по показателю «плесневые грибы» регистрировали в 2016 г. (9,6% выявлений) и в 2017 г. (7,3%). Превышение уровня общей бактериальной обсемененности выявляли в 2017 г. (2,4%) и в 2018 г. (0,5%).

К 2018 г. отмечен рост несоответствий по показателю «дрожжи» (с 14,6% в 2016 г. до 23,6% в 2018 г.). В 2016 г. исследований на наличие молочнокислых микроорганизмов не проводили. С 2017 по 2018 г. процент выявления несоответствий по данному показателю вырос с 4 до 15,6.

Уровень обнаружения *L. monocytogenes* составлял в среднем 2,8% в течение 2016 и 2017 гг., к 2018 г. он вырос до 3,7%. Процент выделения бактерий рода *Salmonella* увеличился с 0,9 в 2016 г. до 1,5 в 2017 и 2018 гг.

Представленные данные свидетельствуют о положительной тенденции к снижению выявления золотистого стафилококка в пищевых продуктах и энтеропатогенных типов кишечной палочки в кормах.

Анализ результатов исследований по микробиологическим показателям, полученных при выполнении государственных работ

В соответствии с программой «Реформа контрольной и надзорной деятельности», утвержденной в де-

кабре 2016 г., Россельхознадзором разработан ведомственный паспорт реализации проектов по данному направлению. Паспорт предусматривает реализацию программы в отношении нескольких видов государственного контроля (надзора), в том числе федерального государственного ветеринарного надзора и ветеринарного контроля в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации и (или) в местах полного таможенного оформления. А также обеспечивает применение риск-ориентированного подхода при проведении контрольно-надзорных мероприятий в рамках установленных видов контроля (надзора).

Сравнение результатов выполнения работ «Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов» и «Безопасность пищевой продукции» в целом за анализируемый период, представленное на рисунке 3, отражает риск-ориентированный подход при планировании объемов и перечней микробиологических показателей по разным видам работ. Следует отметить, что проценты обнаружения основных микробных контаминантов в сырье и продукции животного происхождения при выполнении мониторинга схожи с аналогичными при осуществлении государственного задания.

Начиная с 2018 г. Филиал ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым участвует в выполнении плана государственного мониторинга. Лабораторией безопасности пищевых продуктов лабораторно-диагностического

Таблица 3

Микробная контаминация продукции животного происхождения, выявленная при реализации государственного задания за период с 2016 по 2018 г.

Table 3

Microbial contamination of animal products, detected within the official programme in 2016–2018

Наименование показателя	Всего исследований	Доля в структуре микробиологических исследований, %	Всего положительных исследований	% выявления
Дрожжи	968	0,8	182	18,8
Дрожжи и плесневые грибы	1079	1,0	200	18,5
Молочнокислые микроорганизмы	306	0,3	39	12,8
КМАФАнМ	23 016	19,7	2842	12,4
Плесневые грибы	594	0,5	51	8,6
БГКП	22 391	19,1	1911	8,5
Энтеропатогенные типы <i>Escherichia coli</i>	2124	1,8	137	6,5
<i>L. monocytogenes</i>	24 562	21,0	766	3,1
Синегнойная палочка <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	173	0,1	5	2,9
Общая бактериальная обсемененность	564	0,5	10	1,8
Золотистый стафилококк <i>Staphylococcus aureus</i>	8170	7,0	130	1,6
Бактерии рода <i>Salmonella</i>	31 392	26,8	404	1,3
Сульфитредуцирующие бактерии рода <i>Clostridium</i>	1074	0,9	7	0,7
Бактерии рода <i>Proteus</i>	588	0,5	2	0,3
Всего	117 001	100	6686	5,7%

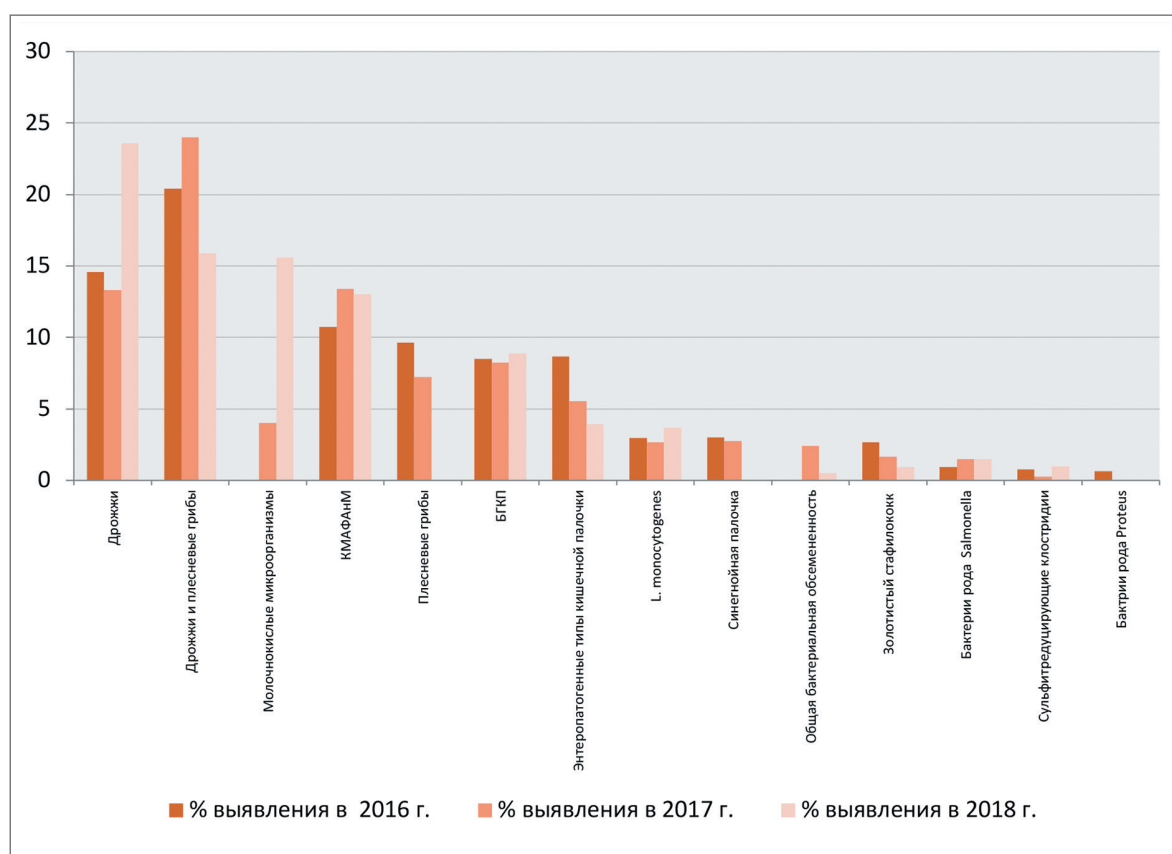


Рис. 2. Динамика выявления несоответствий по микробиологическим показателям при выполнении государственного задания «Безопасность пищевой продукции» в 2016–2018 гг.

Fig. 2. Dynamics of non-compliances detection in microbiological tests within the official programme "Food Safety" in 2016–2018

центра были проведены исследования, в том числе по обнаружению бактерий рода *Salmonella* и бактерии *L. monocytogenes*, процент выделения последних составил 6,7, что в 1,5–2,0 раза выше аналогичного по России. Бактерий рода *Salmonella* выявлено не было.

В таблице 4 данные об общем количестве проведенных исследований и выделенных несоответствий по основным микробиологическим показателям безопасности в рамках выполнения государственных работ представлены по годам.

Представленные данные свидетельствуют об успешном применении риск-ориентированного подхода при планировании государственных работ, что, однако, не отменяет необходимости дальнейших научных исследований в этой области.

Ранее нами был проведен анализ микробной контаминации продукции животного происхождения в странах ЕС по данным информационной системы RASFF. Основными микробными контаминантами продукции животного происхождения были названы бактерии рода *Salmonella* (2719 уведомлений об обнаружении из 3769), *E. coli* (548 уведомлений), *L. monocytogenes* (440 уведомлений) [11].

Процент выделения *L. monocytogenes* из продукции животного происхождения при проведении государственных работ в РФ в 2,5 раза выше, чем бактерий рода *Salmonella*, что отличается от данных по Евросоюзу, где количество обнаружений бактерий рода *Salmonella* в 6 раз больше, чем бактерий *L. monocytogenes* [11].

Следует отметить, что в Регламенте комиссии (ЕС) № 1441/2007 от 05.12.2007, содержащем микробиологические нормативы безопасности для пищевой продукции, отсутствуют показатели БГКП и КМАФАнМ. В отличие от стран ЕС, в РФ наличие данных санитарно-показательных микроорганизмов определяют при проведении государственных работ по безопасности пищевой продукции. По количеству обнаружений данные бактерии стоят на первом месте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всего в 2015–2018 гг. в рамках выполнения государственных работ в 37 подведомственных Россельхознадзору лабораториях было проведено 205 750 исследований по показателям микробиологической безопасности.

Максимальное количество исследований приходилось на обнаружение патогенных бактерий рода *Salmonella* (29,5% при проведении государственного мониторинга и 26,8% при выполнении государственного задания) и *L. monocytogenes* (22 и 21% соответственно). Уровень выявления данных микроорганизмов в сырье и продукции животного происхождения составил для бактерий рода *Salmonella* 1,8% при проведении государственного мониторинга и 1,3% при выполнении государственного задания; для *L. monocytogenes* – 4,2 и 3,1% соответственно.

Определены показатели, процент выявления которых при выполнении государственных работ составил

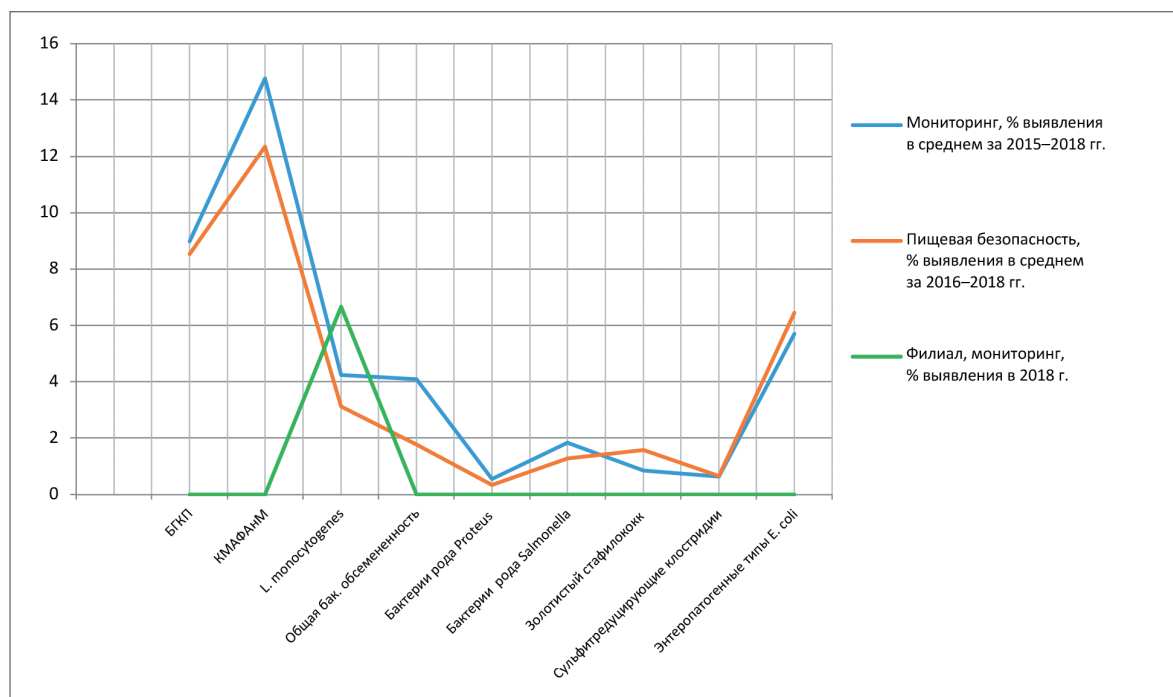


Рис. 3. Результаты выполнения государственных работ по микробиологическим показателям

Fig. 3. Results of official microbiological testing

Таблица 4

Общее количество исследований и общее количество положительных исследований по основным микробиологическим показателям при проведении государственных работ за период с 2016 по 2018 г.

Table 4

Total tests and total positives in tests for major microbiological parameters within official activities in 2016–2018

Наименование показателя	2016 г.		2017 г.		2018 г.	
	Всего исследований (ГЗ + ПМ)	Всего положительных (ГЗ + ПМ)	Всего исследований (ГЗ + ПМ)	Всего положительных (ГЗ + ПМ)	Всего исследований (ГЗ + ПМ)	Всего положительных (ГЗ + ПМ)
Бактерии рода <i>Salmonella</i>	22 338	297	18 013	333	18 497	300
<i>L. monocytogenes</i>	15 984	584	14 500	508	14 450	601
КМАФАнМ	15 078	1806	13 235	1998	12 613	1820
БГКП	12 927	1175	11 916	989	12 845	1148
Золотистый стафилококк <i>Staphylococcus aureus</i>	4263	89	3470	38	4248	39
Сульфитредуцирующие бактерии рода <i>Clostridium</i>	595	3	561	2	462	6
Парагемолитический вибрион <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	411	0	392	0	343	0

«ГЗ» – государственное задание «Безопасность пищевой продукции»;
«ПМ» – «Мониторинг качества и безопасности пищевых продуктов».

менее 1. Это парагемолитический вибрион, бактерии рода *Proteus* и сульфитредуцирующие клостридии. Низкий процент выявления данных микроорганизмов в течение всего анализируемого периода может служить поводом к сокращению количества подобных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 9, 10 см. REFERENCES)

- Сэдик Д., Ульбрихт К., Джаманкулов Н. Система контроля безопасности пищевой продукции в Европейском союзе и Евразийском экономическом союзе. *Торговая политика*. 2016; 2 (6): 41–83. eLIBRARY ID: 29392941.
- Толстова Е. Г. Система ХАССП как методологическая основа обеспечения безопасности продуктов питания. *Вестник БГАУ*. 2014; 1 (29): 130–133. eLIBRARY ID: 21455263.
- Димитриев А. Д., Трифонова А. Ю., Андреева М. Г. Исследование реализации принципов ХАССП в системе индустрии питания. *Тенденции развития науки и образования*. 2018; 43-8: 21–24. DOI: 10.18411/lj-10-2018-185.
- Тихонов Б. Б., Тихонова Н. А. Проблемы внедрения систем менеджмента качества и ХАССП на российских предприятиях. *Эффективные системы менеджмента – стратегия успеха*. 2014; 1 (4): 62. eLIBRARY ID: 23386009.
- Димитриев А. Д., Ежкова Г. О., Димитриев Д. А. Управление качеством пищевой продукции на принципах ХАССП в системе общественного питания: учебное пособие. Казань: КНИТУ; 2017. 156 с.
- Уалиулла Б., Бортанова Ж., Мухамедиева М., Уажанова Р. У. Рассмотрение и изучение законодательства ЕС о безопасности продуктов питания: Регламент № 852/2004 по гигиене пищевых продуктов. *Международный журнал экспериментального образования*. 2017; 4-1: 33–35. eLIBRARY ID: 28939412.
- Кампилобактериоз. *Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ)*. Опубликовано 23.01.2018. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>.
- Иванова О. Е. Ветеринарно-санитарная оценка и совершенствование методов детекции и идентификации бактерий рода *Campylobacter* в мясе птицы: автореф. дис. ... канд. вет. наук. М.; 2017. 26 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01006658614#?page=1>.
- Бородкина И. В., Шадрова Н. Б., Прунтова О. В., Данильченко С. И. Анализ микробной контаминации продуктов животного и растительного происхождения по данным информационной системы RASFF за

период с 2013 по 2017 год. *Известия сельскохозяйственной науки Украины*. 2019; 18 (181): 84–93. eLIBRARY ID: 38528937.

REFERENCES

1. Sedik D., Ulbricht C., Dzhambankulov N. Control system food safety in the European Union and the Eurasian Economic Union. *Trade policy*. 2016; 2 (6): 41–83. eLIBRARY ID: 29392941. (in Russian)
2. Tolstova E. G. HACCP system as a methodological basis to provide foodstuff safety. *Vestnik BGAIU*. 2014; 1 (29): 130–133. eLIBRARY ID: 21455263. (in Russian)
3. Dimitriev A. D., Trifonova A. Yu., Andreeva M. G. Study of HACCP principle implementation in catering industry [Issledovanie realizatsii principov HASSP v sisteme industrii pitaniya]. *Tendencii razvitiya nauki i obrazovaniya*. 2018; 43-8: 21–24. DOI: 10.18411/lj-10-2018-185. (in Russian)
4. Tikhonov B. B., Tikhonova N. A. Problems of implementation of quality management systems and HACCP at the Russian companies. *Effective managements systems – strategies of success*. 2014; 1 (4): 62. eLIBRARY ID: 23386009. (in Russian)
5. Dimitriev A. D., Ezhkova G. O., Dimitriev D. A. Food quality management based on HACCP principles in public catering [Upravlenie kachestvom pishchevoj produkcii na principah HASSP v sisteme obshchestvennogo pitaniya]: study guide. Kazan: KNITU; 2017. 156. (in Russian)
6. Ualiulla B., Bortanova Zh., Mikhamedieva M., Uazhanova R. Examination and analysis of EU legislation on food safety: Regulation No. 852/2004 on food hygiene [Rassmotrenie i izuchenie zakonodatel'stva ES o bezopasnosti produktov pitaniya: Reglament № 852/2004 po gigiene

pishchevyh produktov]. *International Journal of Experimental Education*. 2017; 4-1: 33–35. eLIBRARY ID: 28939412. (in Russian)

7. *Campylobacter*. *World Health Organization (WHO)*. Published on 23.01.2018. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>.

8. Ivanova O. Ye. Veterinary and sanitary assessment and improvement of techniques for detection and identification of *Campylobacter* bacteria in poultry meat [Veterinarno-sanitarnaya ocenka i sovershenstvovanie metodov detekcii i identifikatsii bakterij roda *Campylobacter* v myase pticy]: abstract of the Candidate's thesis (Veterinary Medicine). M.; 2017. 26. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01006658614#?page=1>. (in Russian)

9. Coker A. O., Isokephi R. D., Thomas B. N., Amisu K. O., Obi C. L. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (3): 237–244. DOI: 10.3201/eid0803.010233.

10. Oberhelman R. A., Taylor D. N. *Campylobacter* infections in developing countries. In: *Campylobacter* (2nd ed.). eds. I. Nachamkin, M. J. Blaser. Washington: ASM Press; 2000; 139–153.

11. Borodkina I. V., Shadrova N. B., Pruntova O. V., Danilchenko S. I. Analysis of microbial contamination of products of animal and plant origin according to the information of the RASFF system in the period from 2013 to 2017. *Transactions of Taurida Agricultural Science*. 2019; 18 (181): 84–93. eLIBRARY ID: 38528937. (in Russian)

Поступила 22.10.19

Принята в печать 11.12.19

Received on 22.10.19

Approved for publication on 11.12.19

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бородкина Инна Валериевна, аспирант, руководитель сектора Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Шадрова Наталья Борисовна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Ручнова Ольга Ивановна, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела координации научно-исследовательских работ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Ерофеева Елена Сергеевна, аспирант, заведующий лабораторией безопасности пищевых продуктов Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Данильченко Сергей Иванович, кандидат ветеринарных наук, руководитель лабораторно-диагностического центра Филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Ерофеев Сергей Геннадьевич, кандидат ветеринарных наук, руководитель сектора по взаимодействию с Филиалом ФГБУ «ВНИИЗЖ» в Республике Крым, г. Симферополь, Россия.

Inna V. Borodkina, Post-Graduate Student, Head of the Sector, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia.

Natalya B. Shadrova, Candidate of Science (Biology), Head of Microbiology Laboratory, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert of the Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga I. Ruchnova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher of the Department for Research Coordination, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yelena S. Yerofeeva, Post-Graduate Student, Head of Food Safety Laboratory, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia

Sergey I. Danilchenko, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory and Diagnostic Centre, FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia.

Sergey G. Yerofeev, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of the Unit of Interaction with the FGBI "ARRIAH" Branch in the Republic of Crimea, Simferopol city, Russia.

Микотоксикологический мониторинг.

Сообщение 1. Полнорационные комбикорма для свиней и птицы (2009–2018 гг.)

Г. П. Кононенко¹, А. А. Буркин², Е. В. Зотова³

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук» (ВНИИВСГЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0002-9144-615X, e-mail: kononenkogp@mail.ru

² ORCID 0000-0002-5674-2818, e-mail: aaburkin@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-1479-8602, e-mail: ezotova63@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты 10-летнего ежегодного микотоксикологического обследования полнорационных комбикормов для свиней и сельскохозяйственной птицы, предоставленных хозяйствами и перерабатывающими предприятиями Северо-Западного, Центрального, Южного, Приволжского и Уральского федеральных округов. Методом конкурентного иммуноферментного анализа показано, что Т-2 токсин, дезоксиниваленол, зеараленон, фумонизины группы В, альтернариол, охратоксин А, цитринин, микофеноловая кислота, эргоалкалоиды и эмодин встречаются с частотой более 5%, их количества варьируют в пределах одного-трех порядков, и количества Т-2 токсина, дезоксиниваленола, зеараленона, фумонизинов и охратоксина А могут превышать регламенты допустимого содержания в зерне, предназначенном на кормовые цели. Диацетоксисцирпеннол, афлатоксин В₁, стеригматоцистин и циклопизоновая кислота относятся к группе редких загрязнителей. Установлено, что высокая загрязненность комбикормов Т-2 токсином и эмодином сохраняет по годам устойчивый характер, в отдельные годы возрастает встречаемость дезоксиниваленола, фумонизинов, а также охратоксина А, цитринина, микофеноловой кислоты и эргоалкалоидов. В 2016–2018 гг. отмечено обострение ситуации по загрязненности комбикормов альтернариолом при положительной тенденции снижения контаминации фумонизинами и сохранения стабильно низкой встречаемости зеараленона. Факт обширной распространенности эмомина, известного как «диарейный фактор», а также спорадического, в отдельные периоды наблюдений, возрастания контаминации комбикормов альтернариолом, цитринином и микофеноловой кислотой – микотоксинами с особо опасными формами токсического действия и негативными отдаленными последствиями – выявлен впервые. Эта информация подтверждает необходимость их введения в группу нормируемых санитарно-значимых показателей. Обсуждаются общие черты контаминации комбикормов для свиней и птицы, а также целесообразность региональных обследований для прогнозирования рисков развития интоксикаций. Особое внимание уделяется актуальности выполнения проектов, направленных на формирование единых информационных ресурсов, которые могут стать уникальной научной базой для инноваций в сфере профилактики кормовых отравлений. Исходные данные мониторинга, систематизированные и обобщенные в данной работе, представлены в электронном виде в разделе «Дополнительные материалы».

Ключевые слова: полнорационные комбикорма, микотоксины, мониторинг, иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Кононенко Г. П., Буркин А. А., Зотова Е. В. Микотоксикологический мониторинг. Сообщение 1. Полнорационные комбикорма для свиней и птицы (2009–2018 гг.). *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 60–65. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кононенко Галина Пантелеевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией микотоксикологии и санитарии кормов ВНИИВСГЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 123022, Россия, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, e-mail: kononenkogp@mail.ru.

Mycotoxicological monitoring.

Part 1. Complete mixed feed for pigs and poultry (2009–2018)

G. P. Kononenko¹, A. A. Burkin², Ye. V. Zotova³

All-Russia Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology – Branch of the Federal State-Financed Scientific Institution “Federal Scientific Centre – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences”, Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0002-9144-615X, e-mail: kononenkogp@mail.ru

² ORCID 0000-0002-5674-2818, e-mail: aaburkin@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-1479-8602, e-mail: ezotova63@gmail.com

SUMMARY

Results of the ten-year annual mycotoxicological testing of complete mixed feeds for pigs and poultry submitted by holdings and processing establishments located in the Northwestern, Central, Southern, Volga and Ural Federal Districts are presented. Competitive ELISA tests showed that the occurrence of T-2 toxin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins of group B, alternariol, ochratoxin A, citrinin, mycophenolic acid, ergot alkaloids and emodin was about 5% and quantities thereof varied within one or three orders; quantities of T-2 toxin, deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, and ochratoxin A might exceed maximum admissible levels for feed grains. Diacetoxyscirpenol, aflatoxin B₁, sterigmatocystin and cyclopiazonic acid belonged to group of rare contaminants. Level of feed contamination with T-2 toxin and emodin was found to be consistently high during the said period; in some of the years occurrence of deoxynivalenol, fumonisins as well as ochratoxin A, citrinin, mycophenolic acid and ergot alkaloids increased. In 2016–2018, mixed feed contamination with alternariol increased whereas contamination with fumonisins steadily decreased and level of zearalenone occurrence remained consistently low. Evidence for a wide occurrence of emodin known as “diarrheic factor” as well as for sporadic increase in mixed feed contamination with alternariol, citrinin, mycophenolic acid, mycotoxins having the highly dangerous toxic impact and long-term adverse effects, was detected for the first time. These data confirmed the need for their inclusion into the regulated group of substances significant for public health. General features of pig and poultry feed contamination as well as usefulness of regional surveys for intoxication risk prediction are described. Special attention is paid to the importance of the projects for creation of common information resources that could become a unique scientific basis for innovations in feed poisoning prevention. Original monitoring data systematized and summarized in the paper are given in electronic format in section Additional materials.

Key words: complete mixed feed, mycotoxins, monitoring, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

For citation: Kononenko G. P., Burkin A. A., Zotova Ye. V. Mycotoxicological monitoring. Part 1. Complete mixed feed for pig and poultry (2009–2018). *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 60–65. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Galina P. Kononenko, Doctor of Science (Biology), Professor, Head of Laboratory for Mycotoxicology and Feed Hygiene, ARRIVSHE – Branch of the FSFSI FSC ARRIEVM RAS, 123022, Russia, Moscow, Zvenigorodskoe shosse, 5; e-mail: kononenkogp@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение безопасности кормов является важнейшим условием успешного развития животноводческих отраслей и перерабатывающих производств. Различия реакций половозрастных групп и видов сельскохозяйственных животных на воздействие природных и антропогенных факторов и многообразие состава рационов придают чрезвычайную сложность проблеме контроля кормовых средств. Непременным условием для ее решения является полнота сведений о ситуации в отношении каждого типа корма по перечню ожидаемых токсикантов, их встречаемости и диапазонам содержания.

В нашей стране давно назрела необходимость создания проектов, направленных на формирование единых информационных ресурсов, которые могут стать уникальной научной базой для инноваций в сфере профилактики кормовых интоксикаций, а также востребованным справочным пособием для специалистов, занимающихся кормопроизводством и кормлением животных. Реализация таких планов предполагает усилия по отработке принципов, обязательных для соблюдения участниками подобных проектов, и выбор оптимальной системы внесения данных, удобных для хранения, пополнения и многоцелевого использования.

Полнорационные комбикорма составляют основу современного промышленного свиноводства и птицеводства. Обобщение и актуализация информации об их загрязненности микотоксинами в ряду многих других нерешенных проблем занимает одно из ведущих мест. Вопрос о создании единого информационного ресурса по результатам микотоксикологической оценки кормов был впервые поднят в 2008 г. на 3-м съезде токсикологов России¹. Мониторинг кормов и агропродукции

организован и проводится Россельхознадзором, однако доступ к результатам ограничен, а сведения, публикуемые в периодических научно-практических и научно-производственных изданиях, материалах съездов и конференций, касаются небольших выборок объектов, часто без указания числа и происхождения исследованных образцов или представлены после обработки по условно принятым критериям [1, 2]. Это затрудняет или делает невозможным их обобщение и свободное использование.

В последние годы опыт создания пополняемых электронных баз данных, в частности в отношении коллекций генотипов микроорганизмов, активно осваивается периодическими научными изданиями [3]. Начальным этапом проекта по формированию информационного ресурса микотоксикологического мониторинга в нашей стране может стать серия публикаций, суммирующих данные аналитических исследований в рамках единого подхода, который даст возможность производить их обработку пользователями с учетом стоящих перед ними задач.

Цель данной работы – обобщение результатов обследования загрязненности микотоксинами полнорационных комбикормов для свиней и птицы за период с 2009 по 2018 г. с представлением исходных данных в учетной электронной базе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были 1338 средних образцов от промышленных партий полнорационных комбикормов для разных половозрастных групп животных, в том числе для свиней типа СК (1075 образцов) и для сельскохозяйственной птицы типа ПК (263 образца), направленные в лабораторию в 2009–2018 гг. для профилактического, входного контроля или диагностики микотоксикозов специалистами комбикормовых предприятий и ветеринарных служб свинокомплексов и птицефабрик Северо-Западного, Центрального,

¹ Буркин А. А., Кононенко Г. П. Методология мониторинговых исследований в оценке риска возникновения острых и хронических микотоксикозов. 3-й съезд токсикологов России: тезисы докладов (2–5 декабря 2008 г.). Под ред. Г. Г. Онищенко, Б. А. Курляндского. М.: 2008; 71–73.

Таблица 1

Микотоксины в полнорационных комбикормах для свиней (обобщенные данные 2009–2018 гг.)

Table 1

Mycotoxins in complete mixed feed for pigs (summarized data for 2009–2018)

Токсин	Встречаемость n^+/n (%)	Содержание, мкг/кг				
		диапазон		среднее значение	медиана	90%-й процентиль
		мин.	макс.			
Т-2	949/1075 (88,3)	4	500	31	20	66
ДОН	411/1075 (38,2)	39	1580	198	100	400
ДАС	5/1075 (0,5)	32	250	89	51	175,2
ЗЕН	125/1075 (11,6)	18	151	36	26	64,6
ФУМ	277/1043 (26,6)	40	6300	421	190	975
АОЛ	377/1043 (36,2)	20	998	61	38	106,6
ОА	294/1051 (30,0)	4	105	10	6	20
ЦИТ	120/1050 (11,4)	20	250	43	32	71
АВ ₁	0/1051 (–)	–	–	–	–	–
СТЕ	14/1042 (1,3)	4	177	22	7	27,2
ЦПК	5/1042 (0,5)	59	148	89	74	128,8
МФК	88/1042 (8,5)	10	5400	99	26	64,3
ЭА	135/1043 (12,9)	5	3970	92	14	65,8
ЭМО	760/915 (83,1)	20	1255	78	51	151,3

 n – число исследованных образцов; n^+ – число образцов, содержащих микотоксин.

Южного, Приволжского, Уральского федеральных округов, преимущественно из областей с интенсивным развитием этих отраслей.

В группу определяемых микотоксинов входили Т-2 токсин (Т-2), диацетоксисцирпенол (ДАС), дезоксиниваленол (ДОН), зеараленон (ЗЕН), фумонизины группы В (ФУМ), альтернариол (АОЛ), охратоксин А (ОА), цитринин (ЦИТ), афлатоксин В₁ (АВ₁), стеригматоцистин (СТЕ), циклопиазоновая кислота (ЦПК), микофеноловая кислота (МФК), эргоалкалоиды (ЭА) и эмодин (ЭМО).

Пробоподготовку проводили в соответствии с унифицированной методикой, основанной на жидкостной экстракции и непрямом конкурентном иммуноферментном анализе, которая была аттестована в 1995–2008 гг. и затем введена в официальные методы контроля². Пределы измерений, определенные по 85%-му уровню связывания антител, составили 2 (АВ₁), 3 (ЭА), 4 (Т-2, ОА, СТЕ), 20 (ЗЕН, АОЛ, ЦИТ, МФК, ЭМО) и 50 (ДАС, ДОН, ФУМ, ЦПК) мкг/кг. В учетной форме базы данных использовали кодирование по критериям: тип комбикорма (ПК, СК), учетный год (1–10), определяемые микотоксины.

Для статистической обработки применяли программы Microsoft Excel 2016 и Statistica, версия 6 с вычислением процента встречаемости по соотношению n^+/n и трех показателей по положительным образцам – среднего арифметического, медианы и 90%-го перцентиля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В комбикормах для свиней выявлены 13 микотоксинов из 14 анализированных, за исключением АВ₁ (табл. 1). Чаще других обнаруживали Т-2 и ЭМО, менее чем в 5% случаев – ДАС, СТЕ и ЦПК, а остальные – с частотой от 8,5 до 38,2%. Количество токсинов, как правило, варьировало в пределах одного-двух порядков, для ЭА – в трех. Для всех контаминантов отмечалось смещение медиан в сторону меньших значений по отношению к средним, что свидетельствовало о единообразной несимметричности распределения содержаний, в котором половина уровней накопления была меньше остальных. Кроме того, наибольшие количества были всегда выше, чем пороговые концентрации для 90% значений (90%-й перцентиль), и особенно резко выражены у МФК и ЭА. Все это указывало на возможность аномально высоких накоплений токсинов на фоне типичных ситуаций. Наибольшие содержания Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ и ОА, определенные в комбикормах, были выше допустимых норм в зерне, предназначенном на кормовые цели [4].

В комбикормах для птицы АВ₁ был детектирован в 1,1% образцов, ДАС не обнаружен, и при этом отчетливо прослеживалось сходство с комбикормами для свиней по наибольшему распространению Т-2 и ЭМО, редкому детектированию СТЕ и ЦПК, близкому диапазону встречаемости для остальных 10 микотоксинов – 9,5–47,9%, степени варьирования их количеств и характеру смещений медиан к средним значениям и 90%-го перцентиля к наибольшим содержаниям (табл. 2). Такое

² ГОСТ 31653-2012 Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. М.: Стандартинформ; 2012. 11 с.

Таблица 2

Микотоксины в полнорационных комбикормах для сельскохозяйственной птицы (обобщенные данные 2009–2018 гг.)

Table 2

Mycotoxins in complete mixed feed for poultry (summarized data for 2009–2018)

Токсин	Встречаемость n^+/n (%)	Содержание, мкг/кг				
		диапазон		среднее значение	медиана	90%-й процентиль
		мин.	макс.			
Т-2	208/263 (79,1)	4	280	25	12	63,3
ДОН	85/263 (32,3)	50	757	181	112	462,4
ДАС	0/263 (–)	–	–	–	–	–
ЗЕН	45/263 (17,1)	20	334	37	25	54,6
ФУМ	95/263 (36,1)	50	5000	350,5	165	585
АОЛ	126/263 (47,9)	20	595	85	47	200
ОА	87/263 (33,1)	4	107	9	5	14,6
ЦИТ	25/263 (9,5)	20	194	55	33	132
AB ₁	3/263 (1,1)	2	12	6	4	10,4
СТЕ	4/263 (1,5)	8	11	10	10,5	11
ЦПК	2/263 (0,8)	50	123	86,5	86,5	115,7
МФК	32/263 (12,2)	20	158	43	31,5	80,5
ЭА	35/263 (13,3)	3	5000	311	15	159,6
ЭМО	149/201 (74,1)	14	536	76	50	162

 n – число исследованных образцов; n^+ – число образцов, содержащих микотоксин.

единообразие вполне объяснимо общими типами сырья, составляющего основу рецептов (зерно пшеницы, ячменя, кукурузы, шрот и жмых подсолнечный, соевый шрот), а также сопоставимыми соотношениями в рецептах, несмотря на варьирование в зависимости от категорий поголовья. В полнорационных комбикормах, как для свиней, так и для птицы, группу микотоксинов, встречающихся с частотой более 5%, представляли фузариотоксины (Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ), АОЛ, а также ОА, ЦИТ, МФК, ЭА и ЭМО.

Выборочные обследования комбикормов, инициативно начатые во ВНИИВСГЭ в 1997 г., ранее обсуждались в публикациях по мере накопления сведений. В 1997–2004 гг. для 766 товарных партий, использованных в промышленном птицеводстве, общий показатель загрязненности микотоксинами составил 34,6–79,5%, наиболее распространенным в комбикормах был Т-2 (38,5% образцов) при содержаниях 30–59 мкг/кг, в отдельных образцах – 550 мкг/кг, с меньшей частотой находили ДОН (13,7%), ЗЕН (10,3%) и ФУМ (9,9%), случаи обнаружения ОА в количествах от 10 до 33 мкг/кг варьировали от 15,2 до 42,2%, АВ₁ встречался редко (1,6%) и СТЕ обнаружен не был³. Результаты за 2005–2009 гг., подтвердившие выводы по предыдущему этапу и представившие новую информацию о том, что ДАС существенно уступает остальным фузариотоксинам по встречаемости, ЦИТ активно участвует в контаминации,

а ЦПК отсутствует^{4,5}, позволили сформулировать первые конкретные предложения, направленные на совершенствование микотоксикологического контроля [5]. В дальнейшем были опубликованы краткие сообщения о частой встречаемости токсина антрахинового ряда ЭМО, известного как «диарейный фактор», в диапазоне содержаний от десятков до тысяч мкг/кг по выборке из 29 образцов⁶, о распространенности ЭА за 2008–2013 гг. [6], АОЛ за 2009–2014 гг. и МФК за 2007–2014 гг. с описанием случая аномального накопления этого токсина (5400 мкг/кг) в плотной слежавшейся фракции комбикорма для поросят из-за интенсивного инфицирования высокотоксигенными видами грибов рода *Penicillium*⁸. Подробный анализ всего массива

⁴ Кононенко Г. П., Буркин А. А. Микотоксикологический контроль кормового сырья и комбикормов. *Актуальные проблемы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации: материалы съезда фармакологов и токсикологов России*. СПб.; 2011; 242–244.

⁵ Кононенко Г. П., Буркин А. А. Успехи и проблемы формирования базы данных по санитарно-значимым микотоксинам в кормах. *Современная микология в России*. М.: Нац. акад. микол.; 2012; 428–429.

⁶ Кононенко Г. П., Буркин А. А. Эмодин: контаминация зерновых кормов. *Успехи медицинской микологии*. 2007; 9: 88–89.

⁷ Буркин А. А., Кононенко Г. П. Распространенность альтернатива в биологических объектах. *Современная микология в России: материалы III Международного микологического форума (14–15 апреля 2015 г.)*. Под ред. Ю. Т. Дьякова, Ю. В. Сергеева. М.: Нац. акад. микол.; 2015; 5: 223–225.

⁸ Кононенко Г. П., Буркин А. А. Микофеноловая кислота: распространение в биологических объектах. *Современная микология в России: материалы III Международного микологического форума (14–15 апреля 2015 г.)*. Под ред. Ю. Т. Дьякова, Ю. В. Сергеева. М.: Нац. акад. микол.; 2015; 4: 201–203.

³ Кононенко Г. П. Система микотоксикологического контроля объектов ветеринарно-санитарного и экологического надзора: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2005. 49 с.

данных, позволяющий оценить риски контаминации комбикормов микотоксинами, представляется в этой работе впервые.

Динамика ежегодного варьирования встречаемости 10 основных контаминантов представлена на рисунке. Загрязненность Т-2 и ЭМО сохранялась на высоком уровне, что указывает на широкое распространение их продуцентов. Значительные колебания встречаемости ДОН, ФУМ и АОЛ с кратным усилением в отдельные годы связаны, по-видимому, с особенностями контаминации зерна, поставляемого на региональные комбикормовые предприятия, поскольку пораженность фузариозом и альтернариозом имеет разную выраженность как по территориям, так и по годам. В 2016–2018 гг. наблюдалось обострение ситуации по загрязненности АОЛ. В целом как положительную тенденцию последних четырех лет можно отметить пониженную контаминацию комбикормов ФУМ и стабильно слабую – ЗЕН (рис.).

Резкое возрастание частоты выявления ОА, ЦИТ, МФК и ЭА в отдельные годы может быть обусловлено как известной очаговой встречаемостью, так и неблагоприятным стечением обстоятельств при уборке, транспортировке и хранении агропродукции до и после переработки.

Исходные данные 10-летнего мониторинга полнорационных комбикормов для свиней и сельскохозяйственной птицы, систематизированные и обобщенные в данной работе, представлены в разделе «Дополнительные материалы» в электронном виде по адресу: <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65>. Доступность полной базы позволяет проводить любые другие варианты их обработки, например, учет случаев единичной и сочетанной контаминации, совместной встречаемости ОА и ЦИТ, которая наблюдается достаточно часто [7, 8] и может быть причиной усиления их нефротоксического действия [9], соотношения количеств Т-2 и ДАС, близких по уровню токсичности,

а также подсчет случаев сверхнормативной загрязненности, когда будут введены регламенты допустимого содержания микотоксинов на государственном уровне. Следует заметить, что широкий ареал сбора образцов, использованных в данном исследовании, не позволяет рассматривать региональные аспекты. Тем не менее сведения, полученные для конкретных территорий, имеют особую ценность, поскольку дают уникальную возможность составить представление о контаминации фуражного зерна. Обследование фуражного зерна для прогнозирования рисков крайне затруднительно из-за больших масштабов заготовки и многообразия почвенно-климатических факторов, способных оказывать влияние на микотоксикологическую ситуацию. В этих условиях кормосмеси со значительной долей зерновых ингредиентов вполне могут быть использованы как экологические маркеры. В ряде европейских стран отслеживание контаминации микотоксинами продовольственного зерна по результатам анализа хлебной продукции, реализуемой через торговые сети, было опробовано, признано экономически целесообразным и уже стало международной практикой [10, 11, 12]. К сожалению, специальные региональные проекты по оценке состояния комбикормов в нашей стране пока не проводятся, и лишь в разделах диссертационных работ, посвященных широкому кругу смежных проблем [13, 14], результаты по выборкам представлены в обобщенном виде и не всегда отнесены к определенным типам комбикормовой продукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе обширного мониторинга, проведенного в режиме ежегодного сбора данных за последние 10 лет, установлены общие черты и особенности контаминации микотоксинами полнорационных комбикормов для свиней и сельскохозяйственной птицы. Полученные результаты подтвердили актуальность регулярной оценки их загрязненности фузариотоксинами, охратоксином А,

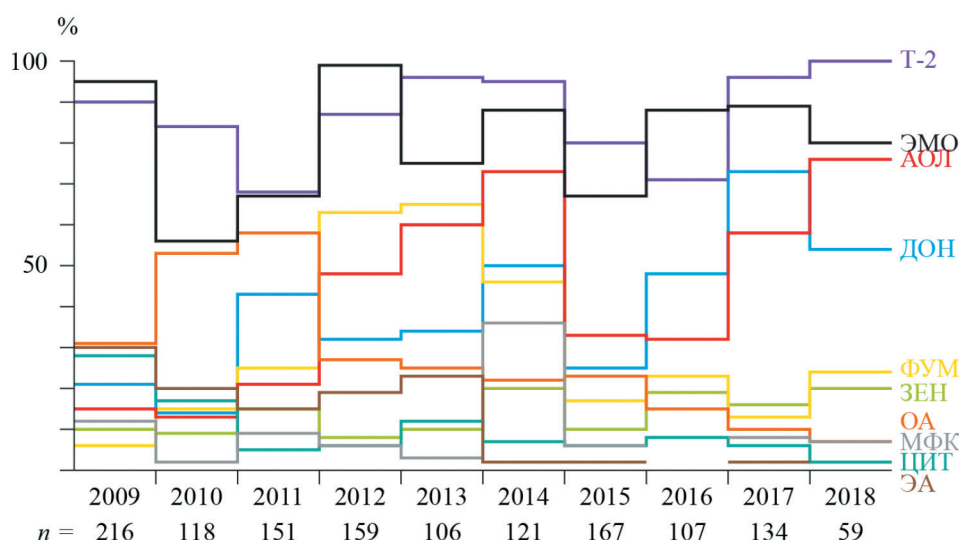


Рис. Динамика ежегодной встречаемости Т-2 токсина (Т-2), дезоксиниваленола (ДОН), зеараленона (ЗЕН), фумонизинов (ФУМ), альтернариола (АОЛ), охратоксина А (ОА), цитринина (ЦИТ), микофеноловой кислоты (МФК), эргоалкалоидов (ЭА) и эмодаина (ЭМО) в комбикормах для свиней и птицы (обобщенные данные)

Fig. Dynamics of annual occurrence of T-2 toxin (T-2) deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), fumonisins (FUM), alternariol (AOL), ochratoxin A (OA), citrinin (CIT), mycophenolic acid (MPA), ergot alkaloids (EA) and emodin (EMO) in mixed feed for pigs and poultry (summarized data)

регламентированными в кормовом зерне, а также эргоалкалоидами. Для комбикормов рекомендовано расширение перечня санитарно-значимых показателей введением в их число эмодина, токсина антрахинонового ряда, известного как «диарейный фактор», а также альтерналиола, цитринина и микофеноловой кислоты с особо опасными формами токсического действия и негативными отдаленными последствиями. Полученная информация может быть востребована для оценки общей ситуации в сфере кормопроизводства, обоснования критериев регламентации микотоксинов в комбикормах и совершенствования системы контроля продукции на перерабатывающих предприятиях.

Дополнительные материалы к этой статье (учетные формы с базой данных) можно найти по адресу: <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65>.

Additional materials to the paper (records forms with database) can be found at: <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (П. П. 3, 7–12 CM. REFERENCES)

1. Попова С. А., Скопцова Т. И., Лосьякова Е. В. Микотоксины в кормах: причины, последствия, профилактика. *Известия Ветеринарной ГСХА*. 2017; 1: 16–23. eLIBRARY ID: 29095353.
2. Страшила Н., Головная Е., Филиппов М. Мониторинг микотоксинов в сырье и комбикорме. *Комбикорма*. 2010; 8: 63–66. eLIBRARY ID: 16544175.
4. ТР ТС 015/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности зерна» (с изменениями на 15 сентября 2017 года): утв. решением Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011. № 874. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/902320395>.
5. Рекомендации по микотоксикологическому контролю кормов для сельскохозяйственных животных: утв. Минсельхозом России № 25/3098 13.10.2014.
6. Буркин А. А., Кононенко Г. П. Распространение эргоалкалоидов в биологических объектах. *Успехи медицинской микологии (Материалы VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии)*. М: Национальная академия микологии; 2014; 13: 303–304.
13. Безбородова Н. А. Мониторинг микотоксинов в кормах и кормовом сырье и клинико-иммунологические особенности микотоксикозов животных в Уральском регионе: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Екатеринбург; 2009. 20 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003484615#?page=1>.
14. Бурдов Л. Г. Мониторинг микотоксинов, профилактика и лечение микотоксикозов в Удмуртской Республике: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань; 2013. 28 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01005532598#?page=1>.

REFERENCES

1. Popova S. A., Skoptsova T. I., Losyakova Ye. V. Mycotoxins in feed: causes, impact, prevention [Mikotoksiny v kormah: prichiny, posledstviya, profilaktika]. *Izvestiya Velikolukskoy GSKHA*. 2017; 1: 16–23. eLIBRARY ID: 29095353. (in Russian)

2. Strashilina N., Golovnya Ye., Filippov M. Monitoring of mycotoxins in raw materials and mixed feed [Monitoring mikotoksinov v syr'e i kombikorme]. *Kombikorma*. 2010; 8: 63–66. eLIBRARY ID: 16544175. (in Russian)
3. Pasquali M., Beyer M., Logriego A., Audenaert K., Balmes V., Basler R., Boutigny A. L., Chrpová J., Czembor E., Gagkaeva T., González-Jaén M. T., Hofgaard I. S., Köycü N. D., Hoffmann L., Lević J., Marin P., Miedaner T., Migheli Q., Moretti A., Müller M. E., Munaut F., Parikka P., Pallez-Barthel M., Piec J., Scauflaire J., Scherm B., Stanković S., Thrane U., Uhlig S., Vanheule A., Yli-Mattila T., Vogelgsang S. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Front. Microbiol.* 2016; 7:406. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00406.
4. TR CU 015/2011 Technical Regulation of the Customs Union on Safety of Grain (as amended on September 15, 2017): approved by the Customs Union Decision No. 874 of 9 December 2011. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/902320395>. (in Russian)
5. Recommendations on mycotoxicological control of feed for livestock animals [Rekomendacii po mikotoksikologicheskomu kontrolyu kormov dlya sel'skohozyajstvennykh zhivotnykh]: approved by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation No. 25/3098 of 13 October 2014. (in Russian)
6. Burkin A. A., Kononenko G. P. Occurrence of ergot alkaloids in biological objects [Rasprostraneniye ergoalkaloidov v biologicheskikh ob'ektah]. *Advances in Medical Mycology (Proceedings of the VII All-Russia Congress on medical mycology)*. M: National Academy of Mycology; 2014; 13: 303–304. eLIBRARY ID: 22741873 (in Russian)
7. Kononenko G. P., Burkin A. A. A survey on the occurrence of citrinin in feeds and their ingredients in Russia. *Mycotox. Res.* 2008; 24 (1): 3–6. DOI: 10.1007/BF02985263.
8. Kononenko G. P., Burkin A. A. Peculiarities of feed contamination with citrinin and ochratoxin A. *Agricultural Sciences*. 2013; 4 (1): 34–38. DOI: 10.4236/as.2013.41006.
9. Pfohl-Leschowicz A., Manderville R. A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51 (1): 61–99. DOI: 10.1002/mnfr.200600137.
10. Efuntoy M. O. Natural occurrence of aflatoxins in bread in Nigeria. *SINET: Ephiop. J. Sci.* 2004; 27 (1): 69–70. Available at: <https://www.ajol.info/index.php/sinet/article/view/18223/17221>.
11. Rhyne P., Zoller O. Zearalenone in cereals for human nutrition: relevant data for the Swiss population. *Eur. Food Res. Technol.* 2003; 216 (4): 319–322. DOI: 10.1007/s00217-003-0674-7.
12. Schollenberger M., Drochner W., Rüfle M., Suchy S., Terry-Jara H., Müller H. M. Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic bread of the German market. *J. Food Comp. Anal.* 2005; 18 (1): 69–78. DOI: 10.1016/j.jfca.2003.10.009.
13. Besborodova N. A. Monitoring of mycotoxins in feed and feed raw materials and clinical and immunological features of mycotoxicoses in animals in the Ural region [Monitoring mikotoksinov v kormah i kormovom syr'e i kliniko-immunologicheskie osobennosti mikotoksikozov zhivotnykh v Ural'skom regione]: author's abstract of Thesis for the Candidate Degree (Veterinary Medicine). Yekaterinburg; 2009. 20 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003484615#?page=1>. (in Russian)
14. Burdov L. G. Monitoring of mycotoxins, mycotoxicoses prevention and treatment in the Udmurt Republic [Monitoring mikotoksinov, profilaktika i lecheniye mikotoksikozov v Udmurtskoj Respublike]: author's abstract of Thesis for the Candidate Degree (Biology). Kazan; 2013. 28 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01005532598#?page=1>. (in Russian)

Поступила 16.12.19

Принята в печать 18.02.20

Received on 16.12.19

Approved for publication on 18.02.20

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кононенко Галина Пантелеевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией микотоксикологии и санитарии кормов ВНИИВСГЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия.

Буркин Алексей Анатольевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ВНИИВСГЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия.

Зотова Елена Владимировна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ВНИИВСГЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия.

Galina P. Kononenko, Doctor of Science (Biology), Professor, Head of Laboratory for Mycotoxicology and Feed Hygiene, ARRIVSHE – Branch of the FSFSI FSC ARRIEVM RAS, Moscow, Russia.

Alexey A. Burkin, Candidate of Science (Medicine), Senior Researcher, ARRIVSHE – Branch of the FSFSI FSC ARRIEVM RAS, Moscow, Russia.

Yelena V. Zotova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, ARRIVSHE – Branch of the FSFSI FSC ARRIEVM RAS, Moscow, Russia.

Оценка квалификации ветеринарных лабораторий по результатам межлабораторных сличительных испытаний, организованных ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018–2019 гг.

А. Ю. Сухарьков¹, З. Б. Никонова², О. П. Бьядовская³, А. С. Першин⁴, М. И. Шульпин⁵, И. А. Чвала⁶

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0001-5326-2440, e-mail: suharkov@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-0090-9399, e-mail: nikonova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-8326-7151, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5099-3050, e-mail: pershin@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-1484-2319, e-mail: shulpin@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-1659-3256, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Важной задачей при проведении комплекса противоэпизоотических мероприятий, направленных на борьбу с заразными болезнями животных, является лабораторная диагностика. Необходимость в постоянном доверии к качеству работы лаборатории важна не только для исполнителей и заказчиков, но и инспектирующих организаций, органов по аккредитации и др., которые устанавливают требования к деятельности диагностических лабораторий. Недостоверные результаты лабораторных исследований могут привести к постановке неправильного диагноза, а значит, и к серьезным последствиям. Одной из форм экспериментальной проверки деятельности лаборатории с целью определения ее компетентности и подтверждения соответствия критериям аккредитации при инспекционном контроле за ее деятельностью являются межлабораторные сличительные (сравнительные) испытания. Обобщая и анализируя результаты участия в межлабораторных сличительных испытаниях, лаборатория может не только подтвердить свою компетентность в конкретный момент, но и наглядно продемонстрировать, насколько стабильно качество результатов ее анализов. Представлен анализ результатов межлабораторных сличительных испытаний, организованных в 2018–2019 гг. ФГБУ «ВНИИЗЖ» для ветеринарных лабораторий России, по программам выявления возбудителей или антител к возбудителям гриппа птиц, ньюкаслской болезни, бешенства, классической чумы свиней, африканской чумы свиней, блютанга, заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота. Результаты показали, что большинство лабораторий успешно справились с испытаниями. Неудовлетворительный результат был получен участниками по отдельным программам межлабораторных сличительных испытаний (выявление вируса бешенства методом флуоресцирующих антител; выявление вирусов гриппа птиц, классической чумы свиней и заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции). Это указывает на необходимость повышения качества лабораторных исследований не справившихся с заданием участников.

Ключевые слова: межлабораторные сличительные испытания, инфекционные болезни животных, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, метод флуоресцирующих антител.

Для цитирования: Сухарьков А. Ю., Никонова З. Б., Бьядовская О. П., Першин А. С., Шульпин М. И., Чвала И. А. Оценка квалификации ветеринарных лабораторий по результатам межлабораторных сличительных испытаний, организованных ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018–2019 гг. *Ветеринария сегодня*. 2020;1 (32): 66–70. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-66-70.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Сухарьков Андрей Юрьевич, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьево, e-mail: suharkov@arriah.ru.

UDC 619:57.081.22:57.083.2

Evaluation of veterinary laboratory proficiency based on results of interlaboratory comparisons organized by FGBI “ARRIAH” in 2018–2019

A. Yu. Sukharkov¹, Z. B. Nikonova², O. P. Byadovskaya³, A. S. Pershin⁴, M. I. Shulpin⁵, I. A. Chvala⁶

FGBI “Federal Centre for Animal Health” (FGBI “ARRIAH”), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0001-5326-2440, e-mail: suharkov@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-0090-9399, e-mail: nikonova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-8326-7151, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-5099-3050, e-mail: pershin@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-1484-2319, e-mail: shulpin@arriah.ru⁶ ORCID 0000-0002-1659-3256, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

Laboratory diagnosis is a crucial component in implementation of the set of anti-epidemic measures aimed at contagious animal disease control. The need for unswerving trust in the quality of laboratory performance is a matter of importance not only for service providers and customers, but also for inspecting organizations, accreditation bodies, etc. that establish performance requirements for diagnostic laboratories. Incorrect laboratory test results can lead to a misdiagnosis and, therefore, to grave consequences. One of the forms of experimental verification of a laboratory's performance with a view to determine the laboratory's competence and to verify its compliance with accreditation criteria as part of inspection control of the laboratory's activities is interlaboratory comparison. The laboratory can prove its competence at a particular time, as well as clearly demonstrate how stable the quality of its test results is by summarizing and analyzing the results of its participation in interlaboratory comparisons. The analysis of the results of the interlaboratory comparisons (programmes for detection of causative agents or antibodies to the causative agents of avian influenza, Newcastle disease, rabies, classical swine fever, African swine fever, bluetongue, lumpy skin disease) organized by the FGBI "ARRIAH" for the veterinary laboratories of the Russian Federation in 2018–2019 is presented. The results showed that most of the laboratories had passed the tests successfully. The results submitted by participants were unsatisfactory in some interlaboratory comparison programmes (rabies virus detection using fluorescent antibody technique; detection of avian influenza, classical swine fever and lumpy skin disease viruses using polymerase chain reaction). That highlights the need for those participants who failed the tests to improve their laboratory testing quality.

Key words: interlaboratory comparisons, infectious animal diseases, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescent antibody technique.

For citation: Sukharkov A. Yu., Nikonova Z. B., Byadovskaya O. P., Pershin A. S., Shulpin M. I., Chvala I. A. Evaluation of veterinary laboratory proficiency based on results of interlaboratory comparisons organized by FGBI "ARRIAH" in 2018–2019. *Veterinary Science Today*. 2020;1 (32): 66–70. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-66-70.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Andrey Yu. Sukharkov, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: suharkov@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Отдельные регионы России сохраняют статус неблагополучных по ряду инфекционных болезней животных. Для эффективной борьбы с заразными болезнями необходим полноценный комплекс противоэпизоотических мероприятий, одной из важнейших задач которого является лабораторная диагностика. Недостовверные результаты лабораторных исследований могут привести к серьезным последствиям. Необходимость в постоянном доверии к качеству работы лаборатории важна не только для исполнителей и заказчиков, но и инспектирующих организаций, органов по аккредитации и др., которые устанавливают требования к деятельности диагностических лабораторий [1].

Одним из способов оценки характеристик функционирования лабораторий являются межлабораторные сличительные (сравнительные) испытания (МСИ). Данный вид проверки компетентности лаборатории широко используется, в том числе и в международной практике [2]. Кроме мониторинга достоверности результатов исследований, к задачам МСИ относится также выявление проблем в функционировании лаборатории, различий между лабораториями, установление эффективности и сравнимости методов испытаний или измерений и некоторые другие. Успешное участие в МСИ обеспечивает дополнительное доверие к лаборатории у заказчиков. Кроме того, участие в МСИ является обязательным условием для аккредитованных в национальной системе аккредитации лабораторий [3, 4].

Подведомственный Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») аккредитован в национальной системе аккредитации в качестве провайдера МСИ по ГОСТ ISO/IEC 17043-2013 (номер аттестата аккредитации RA.RU.430258, дата внесения в реестр аккредитованных лиц 16.03.2018 г.). В 2019 г. компетентность

ФГБУ «ВНИИЗЖ» в качестве провайдера МСИ была подтверждена на основании результатов выездной экспертизы (приказ Федеральной службы по аккредитации (Росаккредитация) № ПК1-1180 от 21.06.2019 г.).

Разработанные провайдером программы МСИ в соответствии с утвержденной областью аккредитации позволяют проводить проверку квалификации лабораторий в области диагностики особо опасных инфекционных болезней животных методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментного анализа (ИФА) и методом флуоресцирующих антител (МФА).

Целью работы являлся анализ результатов, полученных в ходе проведения раундов МСИ, организованных ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2018–2019 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали результаты МСИ, организованных в 2018–2019 гг. ФГБУ «ВНИИЗЖ» для ветеринарных лабораторий России, по 10 программам:

- выявление РНК вируса гриппа птиц типа А;
- выявление антител к вирусу гриппа птиц типа А с использованием ИФА;
- выявление антител к вирусу ньюкаслской болезни с использованием ИФА;
- выявление антигена вируса бешенства МФА;
- выявление антител к вирусу африканской чумы свиней с использованием ИФА;
- выявление генома вируса африканской чумы свиней;
- выявление антител к вирусу классической чумы свиней с использованием ИФА;
- выявление генома вируса классической чумы свиней;
- выявление антител к вирусу блутанга с использованием ИФА;
- выявление генома вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота.

Ежегодно проводили по одному раунду МСИ по каждой программе согласно утвержденному плану МСИ. Для проведения МСИ использовалась «Программа разделенных выборок», предусматривающая испытание идентичных контрольных образцов, сделанных из одного материала или специальным образом подготовленного материала, разделенного на две и более части с тем, чтобы каждый участник МСИ выполнил испытания контрольных образцов из этой выборки [1]. Все контрольные образцы проходят проверку на соответствие приписанным значениям, однородность и стабильность в строгом соответствии с утвержденной провайдером МСИ процедурой.

Полученные данные по каждой из программ МСИ подробно представлены в отчетах на сайте провайдера МСИ ФГБУ «ВНИИЗЖ» в соответствующем разделе «Проведение МСИ» (<http://www.arriah.ru/main/lprovedenie-msi>). Информация об участниках представлена в обезличенном виде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Квалификацию 46 ветеринарных лабораторий из 37 регионов Российской Федерации по диагностике семи опасных болезней животных (гриппа птиц, ньюкаслской болезни, бешенства, классической чумы свиней (КЧС), африканской чумы свиней (АЧС), заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота (ЗУД КРС), блютанга) с использованием методов ПЦР, ИФА и МФА оценивали на основании результатов, полученных при реализации программ МСИ. Критерием для оценки было соответствие предоставленных результатов исследований приписанным значениям контрольных образцов с учетом шифрования. Удовлетворительным результатом признавали правильное определение всех контрольных образцов в панели. Все использованные программы МСИ основаны на качественном определении показателя приписанного контрольного образца. При наличии несоответствия приписанному значению хотя бы одного контрольного образца ре-

зультат МСИ оценивали как неудовлетворительный.

В таблице 1 представлено общее количество лабораторий-участников по каждой программе МСИ за 2018–2019 гг. и количество участников, допустивших ошибки и не справившихся с заданием.

Как видно из представленных в таблице 1 данных, несоответствия были выявлены в результатах МСИ по 4 из 10 реализованным программам. Выполнение этих программ предусматривает использование МФА или ПЦР. При этом участники всех программ МСИ по выявлению антител к возбудителям инфекционных болезней животных методом ИФА успешно справились с заданием, используя в работе коммерческие наборы как зарубежного, так и отечественного производства.

Наибольшее количество ошибок было выявлено у участников проверки квалификации по выявлению антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител – основного метода диагностики данного заболевания (с заданием справились 90,7% лабораторий). С учетом неблагополучной эпизоотической обстановки по бешенству на большей части территории России неудовлетворительные результаты МСИ по диагностике этого смертельного заболевания животных и человека вызывают особую тревогу. Важно отметить, что МФА требует высокой квалификации и опыта персонала, а также постоянного поддержания флуоресцентного микроскопа в должном техническом состоянии (своевременная замена ламп и пр.). Кроме того, к интерпретации результатов МФА рекомендуется привлекать не менее двух специалистов.

В программах МСИ по выявлению вирусов гриппа птиц, КЧС и ЗУД КРС методом ПЦР доля справившихся с заданием лабораторий составила соответственно 96,2, 94,1 и 93,9% от общего числа участников. Метод ПЦР состоит из нескольких этапов (подготовка образца, выделение нуклеиновых кислот, непосредственно ПЦР, интерпретация и анализ результатов), что повышает вероятность ошибки на каждом из них и получения итогового неудовлетворительного результата.

Таблица 1
Результаты реализации программ МСИ за 2018–2019 гг.

Table 1
Results of interlaboratory comparison programmes carried out in 2018–2019

№ п/п	Показатель в соответствии с областью аккредитации (соотносится с конкретной программой МСИ)	Метод исследования	Количество участников*	Справившиеся с МСИ участники	
				количество	% от общего количества
1	РНК вируса гриппа птиц типа А	ПЦР	26	25	96,2
2	Антитела к вирусу гриппа птиц типа А	ИФА	10	10	100
3	Антитела к вирусу ньюкаслской болезни	ИФА	6	6	100
4	Антиген вируса бешенства	МФА	43	39	90,7
5	Антитела к вирусу АЧС	ИФА	10	10	100
6	Геном вируса АЧС	ПЦР	17	17	100
7	Антитела к вирусу КЧС	ИФА	34	34	100
8	Геном вируса КЧС	ПЦР	51	48	94,1
9	Антитела к вирусу блютанга	ИФА	6	6	100
10	Геном вируса ЗУД КРС	ПЦР	49	46	93,9

* Участие в МСИ одной лабораторией дважды (2018 и 2019 гг.) учитывали как двух участников.

Таблица 2
Ошибки участников раундов МСИ в 2018–2019 гг.

Table 2
Mistakes made by participants of interlaboratory comparison rounds in 2018–2019

№ п/п	Показатель в соответствии с областью аккредитации (соотносится с конкретной программой МСИ)	Метод исследования	Количество не справившихся с МСИ участников	Характер ошибки	
				ложно-положительный результат	ложно-отрицательный результат
1	РНК вируса гриппа птиц типа А	ПЦР	1	0	1
2	Антиген вируса бешенства	МФА	4	1	3
3	Геном вируса КЧС	ПЦР	3	0	3
4	Геном вируса ЗУД КРС	ПЦР	3	0	3

Данный метод требует особенно высокой квалификации персонала и наличия специализированных помещений.

При получении неудовлетворительного результата лаборатории-участнику рекомендуется провести анализ принятой процедуры исследования, выявить возможные причины ошибок и разработать адекватные корректирующие действия (повышение квалификации персонала; усиление контроля за проведением испытаний; ремонт или замену оборудования и средств измерения; смену диагностического набора и др.). Результативность корректирующих действий должна быть подтверждена повторным участием лаборатории в МСИ в возможно короткие сроки.

В таблице 2 представлены ошибки, допущенные участниками раундов МСИ в 2018–2019 гг.

Из представленных в таблице 2 данных следует, что большинство ошибок было связано с получением ложноотрицательного результата, то есть контрольный образец, содержащий возбудитель болезни или антитела к нему, был охарактеризован как негативный. Такие ошибки в лабораторной диагностике опасных болезней животных могут привести к серьезным последствиям: несвоевременной постановке диагноза, недооценке риска распространения заболевания и, как следствие, снижению эффективности противоэпизоотических мероприятий.

Даже в хорошо управляемой лаборатории с опытным персоналом иногда могут быть получены неудовлетворительные результаты испытаний. Особое значение для оценки достоверности результатов исследований играет мониторинг, который может осуществляться посредством не только МСИ, но и внутрилабораторного контроля (повторные исследования образцов в стандартных условиях, использование альтернативного оборудования, исследование другим сотрудником, исследование с использованием диагностического набора другого производителя и пр.). Однако, несмотря на наличие внутреннего контроля, лаборатория обязана осуществлять мониторинг своей деятельности путем сравнения с результатами других лабораторий, то есть посредством участия в МСИ [3]. Оценка квалификации лаборатории должна проводиться с учетом результатов предыдущих раундов испытаний, периодичности участия лаборатории в МСИ, уровня охвата области деятельности лаборатории программами проверок квалификации, умения персонала

использовать результаты участия в МСИ для улучшения деятельности и др. [5]. О высокой компетентности лаборатории в проведении конкретных видов исследований могут свидетельствовать стабильно удовлетворительные результаты участия в МСИ.

Все участники организованных ФГБУ «ВНИИЗЖ» раундов МСИ, не справившиеся с заданием в 2018 г., после устранения имевшихся ошибок повторно участвовали в испытаниях в 2019 г. и получили удовлетворительные результаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов проверки квалификации ветеринарных лабораторий, организованной в 2018–2019 гг. ФГБУ «ВНИИЗЖ», показал, что большинство участников успешно справились с испытаниями. Недовлетворительная оценка квалификации некоторых лабораторий в программах МСИ была связана в основном с получением ими ложноотрицательных результатов исследований. Наибольшее количество ошибок допустили участники МСИ по программе «Выявление антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител», с заданием справились 90,7% лабораторий. Кроме того, неудовлетворительные результаты были получены участниками программ МСИ по выявлению вирусов гриппа птиц, КЧС и ЗУД КРС методом ПЦР (с заданием справились 96,2, 94,1 и 93,9% лабораторий соответственно). Полученные данные указывают на наличие ошибок в лабораторной диагностике инфекционных болезней животных у отдельных участников, не справившихся с МСИ, и свидетельствуют о необходимости мероприятий, направленных на улучшение качества их лабораторных исследований. Диагностическим лабораториям следует больше уделять внимания внутреннему контролю качества исследований (желательно с использованием стандартных образцов) и контролю применяемых диагностических наборов, проводить верификацию используемых диагностических методов и обеспечивать необходимый уровень знаний и навыков персонала, проводящего работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ ISO/IEC 17043-2013. Оценка соответствия. Основные требования к проведению проверки квалификации. М.: Стандартинформ; 2014. 34 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200108187>.
- Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 января 2016 г. № 12 «Об утверждении Порядка организации

проведения межлабораторных сравнительных испытаний (межлабораторных сличений)». Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/420333646>.

3. ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 (ISO/IEC 17025-2005). Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. М.: Стандартинформ; 2012. 28 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/gost-iso-mek-17025-2009>.

4. Приказ Минэкономразвития России от 30 мая 2014 г. № 326 «Об утверждении Критериев аккредитации, перечня документов, подтверждающих соответствие заявителя, аккредитованного лица критериям аккредитации, и перечня документов в области стандартизации, соблюдение требований которых заявителями, аккредитованными лицами обеспечивает их соответствие критериям аккредитации» (с изменениями на 19 августа 2019 г.). Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/420203443>.

5. Карташова А. В., Халиков М. Р. МСИ как критерий аккредитации. *Контроль качества продукции*. 2015; 1: 27–30.

REFERENCES

1. GOST ISO/IEC 17043-2013. Conformity assessment. General requirements for proficiency testing. M.: Standartinform; 2014. 34. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200108187>. (in Russian)

2. Decision of the Board of the Eurasian Economic Commission No. 12 dated January 26, 2016 on approval of the Procedure for organization of interlaboratory comparison tests (interlaboratory comparisons). Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420333646>. (in Russian)

3. GOST ISO/IEC 17025-2009 (ISO/IEC 17025-2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. M.: Standartinform; 2012. 28. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/gost-iso-mek-17025-2009>. (in Russian)

4. Order of the Ministry of Economic Development and Trade of the Russian Federation No. 326 dated May 30, 2014 on approval of Criteria for accreditation, the list of documents confirming the compliance of the applicant, accredited person with accreditation criteria and the list of documents in the field of standardization, the requirements of which shall be observed by applicants, accredited persons to ensure their compliance with accreditation criteria (as amended on August 19, 2019). Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420203443>. (in Russian)

5. Kartashova A. V., Khalikov M. R. Interlaboratory comparisons as criterion for accreditation. *Kontrol' kachestva produktsii*. 2015; 1: 27–30. (in Russian)

Поступила 10.01.20

Принята в печать 27.02.19

Received on 10.01.20

Approved for publication on 27.02.19

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сухарьков Андрей Юрьевич, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Никонова Зоя Борисовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бядовская Ольга Петровна, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией болезней КРС ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Першин Андрей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шульпин Михаил Иванович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Andrey Yu. Sukharkov, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Zoya B. Nikonova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Viral Avian Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga P. Byadovskaya, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Andrey S. Pershin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Mikhail I. Shulpin, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research and Monitoring, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Рецензия на монографию К. Н. Груздева, А. Е. Метлина «Бешенство животных» Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. 394 с.: ил. ISBN 978-5-900026-73-2

А. Н. Чернов

Доктор биологических наук, г. Казань, Россия

Для цитирования: Чернов А. Н. Рецензия на монографию К. Н. Груздева, А. Е. Метлина «Бешенство животных». Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. 394 с.: ил. ISBN 978-5-900026-73-2. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 71. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-71.

Peer-review of monograph of K. N. Gruzdev, A. Ye. Metlin "Animal Rabies" Vladimir: FGBI "ARRIAH", 2019. 394 p.: il. ISBN 978-5-900026-73-2

A. N. Chernov

Doctor of Science (Biology), Kazan, Russia

For citation: Chernov A. N. Peer-review of monograph of K. N. Gruzdev, A. Ye. Metlin "Animal Rabies". Vladimir: FGBI "ARRIAH", 2019. 394 p.: il. ISBN 978-5-900026-73-2. *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 71. (In Russ.) DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-71.

Монография «Бешенство животных» посвящена актуальной проблеме, которая и в XXI веке вызывает озабоченность ВОЗ, МЭБ и ФАО в связи с продолжением проявления такого зооноза, как бешенство (*Rabies*).

Бешенство – одно из древнейших и опасных заболеваний животных и человека. По оценке ВОЗ, оно входит в пятерку зоонозов, наносящих наибольший экономический ущерб, и представляет постоянную угрозу для жизни человека и животных. Бешенство включено в список notiфицированных болезней МЭБ.

От бешенства гибнет более 1 млн различных видов животных в год. Сложная эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству в настоящее время наблюдается более чем в 110 странах мира. Бешенство животных, особенно диких плотоядных, является одним из важнейших международных критериев (ВОЗ, ФАО и МЭБ) оценки биологической и экологической безопасности среды обитания человека.

Анализ данных, характеризующих эпизоотическую ситуацию по бешенству в Российской Федерации за 1991–2019 гг., свидетельствует о ее сложности, несмотря на предпринимаемые меры. Активизируются природные очаги бешенства, увеличивается число случаев заболеваний среди диких плотоядных животных, которые являются резервуаром и источниками вируса бешенства. В эпизоотический процесс все более интенсивно стали вовлекаться домашние плотоядные животные – кошки, собаки, что делает специфическую профилактику еще более актуальной.

Аналитические и собственные исследования авторов посвящены изучению эпизоотических данных по вопросам бешенства: распространенности бешенства на территории Российской Федерации и сопредельных стран, методам эпизоотологического мониторинга, оценкам риска при возникновении бешенства у животных, проявлению бешенства у различных видов животных. Большой раздел посвящен диагностике бешенства: представлены разработанные схемы и методы отбора проб головного мозга, меры безопасности при работе с материалом, контаминированным вирусом бешенства. Описаны классические, а также разработанные и усовершенствованные авторами методы лабораторной

диагностики с использованием реакции флуоресценции, различных вариантов иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции, реакции агглютинации латекса, иммунохроматографический анализ, выделение вируса бешенства в культуре клеток, выявление вируса бешенства в слюне.

Широко представлен обзор и результаты собственных исследований по изучению полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства с применением нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа.

Важным с точки зрения использования в практических условиях является раздел «Профилактика бешенства и меры борьбы», где изложена концепция по профилактике бешенства среди плотоядных животных в природной среде. Глубоко проанализирован опыт оральной вакцинации против бешенства в сопредельных с Россией государствах, дана характеристика производимых в различных странах вакцин.

Опубликование монографии К. Н. Груздева и А. Е. Метлина «Бешенство животных» явилось значимым явлением в понимании распространения, диагностики и профилактики бешенства. Авторы в процессе аналитического изучения имеющихся литературных источников и описанного собственного опыта закономерно ставят вопрос о необходимости межгосударственного и межрегионального взаимодействия ветеринарных служб по борьбе с таким зоонозом, как бешенство.

Рецензируемая монография – это весомый вклад российской стороны в достижение цели искоренения бешенства среди людей на глобальном уровне, инициированной ВОЗ, МЭБ, ФАО, GARC и изложенной в новых программах (2015 г.) для решения фундаментальных и ветеринарно-эпидемиологических прикладных задач по надзору и контролю за инфекцией.

Монография содержит большой объем собственных научных данных фундаментального и прикладного характера, аналитические обобщения и выводы. Книга хорошо оформлена и проиллюстрирована. Считаем, что данное издание будет полезно для представителей ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора, научных работников, учащихся различного уровня – аспирантов, слушателей ФПК, студентов, а также специалистов, занимающихся решением вопросов инфекционной патологии и эпизоотологии.



Продовольственная и сельскохозяйственная
организация ООН (ФАО)

ПРЕСС-РЕЛИЗ

Олег Кобяков назначен директором Отделения ФАО для связи с Российской Федерацией

28 февраля 2020 г.,

Москва, Российская Федерация

Генеральный директор ФАО Цюй Дунъюй назначил Кобякова Олега Юльевича директором Отделения ФАО для связи с Российской Федерацией. Это решение вступило в силу 28 февраля 2020 г.

Олег Кобяков – гражданин России, опытный дипломат с 35-летним стажем работы в Министерстве иностранных дел Российской Федерации (МИД России). В 1985 г. окончил Московский государственный институт международных отношений по специальности «история, экономика и право», а в 2000 г. – докторантуру Центра дипломатических и стратегических исследований (Париж, Франция) по специальности «дипломатия и международные отношения».

На протяжении своей дипломатической карьеры работал в посольстве России в Праге, в постоянных представительствах при Европейском союзе (ЕС) в Брюсселе, при ЮНЕСКО в Париже и при ФАО в Риме, а также в Департаменте международных организаций МИД России и в секретариате министра.

В 2011–2016 гг. являлся исполняющим обязанности, а затем заместителем Постоянного представителя Российской Федерации при ФАО и расположенных в Риме учреждениях системы ООН. До перехода в ФАО работал начальником отдела Экономического и социального совета ООН и региональных комиссий ООН Департамента международных организаций МИД России.

Олег Кобяков посвятил более 12 лет своей профессиональной карьеры развитию отношений ФАО с Российской Федерацией. Он обладает обширными знаниями вопросов, относящихся к сфере деятельности ФАО, и богатым практическим опытом международных переговоров по сельскому, лесному и рыбному хозяйству, их адаптации к вызовам современности, включая обеспечение продовольственной безопасности, здорового питания и устойчивого развития.

Он имеет большой практический опыт управления российскими взносами в организации системы ООН (ФАО, Всемирную продовольственную программу, Европейскую экономическую комиссию ООН и Экономическую и социальную комиссию для Азии и Тихого океана) в дополнение к опыту руководства соответствующими проектами технического содействия.



Фото: © Олег Кобяков

Олег Кобяков сыграл ключевую роль в учреждении Постоянного представительства Российской Федерации при расположенных в Риме учреждениях системы ООН в 2011 г. и в открытии Отделения ФАО для связи с Российской Федерацией четыре года спустя. Он также был докладчиком европейских региональных конференций ФАО в Баку (Азербайджан, 2012 г.), Воронеже (Россия, 2018 г.) и членом Исполнительного комитета Европейской комиссии ФАО по сельскому хозяйству в 2015–2017 гг.

Олег Кобяков свободно владеет английским, чешским и русским (родной) языками, знает французский и итальянский.

ССЫЛКИ:

ФАО в Российской Федерации
www.fao.org/russian-federation/fao-in-russia/our-office/ru/

Отделение ФАО для связи в Москве отмечает пятилетнюю годовщину подписания соглашения со страной пребывания (на английском языке)
www.fao.org/russian-federation/news/detail-events/en/c/1259923/

ФАО в Российской Федерации: приоритеты
www.fao.org/russian-federation/priorities/ru/

ФАО в Российской Федерации: новости
www.fao.org/russian-federation/news/ru/

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: **3000–6000 слов**.

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 авторов, место работы авторов, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.**
4. **Резюме** (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков.
5. **Ключевые слова** (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. **Благодарности** (при наличии данных о благодарности людям и финансировании исследований).
7. **Для цитирования**
8. **Конфликт интересов**
9. **Для корреспонденции** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, адрес, электронная почта).
10. **Введение**
11. **Материалы и методы**
12. **Результаты и обсуждение**
13. **Выводы или заключение**
14. **Список литературы** (ванкуверский стиль – расположение источников в порядке их цитирования (появления в тексте)).
15. **Информация об авторах** (фамилия, имя, отчество (полностью), ученая степень, научное звание, должность, город, страна).
16. К размещению принимаются иллюстрированные материалы (фото, графики) 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: Никешина Татьяна Борисовна, e-mail: nikeshina@arriah.ru

«Ветеринария сегодня» – это прекрасная возможность заявить о себе миру!



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

FGBI "FEDERAL CENTRE FOR ANIMAL HEALTH" (FGBI "ARRIAN")

Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру
OIE Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease

**Референтная лаборатория МЭБ по высокопатогенному и низкопатогенному
гриппу птиц и ньюкаслской болезни**

The OIE Reference Laboratory for Highly Pathogenic Avian Influenza and Low Pathogenic
Avian Influenza (Poultry) and Newcastle Disease

**Основными направлениями деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ»
в области обеспечения безопасности пищевой продукции
из гидробионтов и охраны здоровья объектов аквакультуры
являются:**

- мониторинг безопасности биоресурсов и объектов аквакультуры и реализация государственной политики в области обеспечения безопасности продукции животного происхождения;
- осуществление научно-технических работ, направленных на обеспечение биологической безопасности и ветеринарного благополучия Российской Федерации по опасным и экономически значимым инфекционным заболеваниям объектов аквакультуры, проведение эпизоотологических и диагностических исследований на данные заболевания;
- изучение распространения в РФ возбудителей болезней гидробионтов для поддержки экспорта российской продукции;
- изучение вирусных изолятов с целью совершенствования средств диагностики в соответствии с эпизоотической ситуацией;
- проведение научно-исследовательских работ по совершенствованию средств и внедрению эффективных методов диагностики и профилактики опасных и экономически значимых болезней объектов аквакультуры;
- оказание научно-консультативной и практической помощи ветеринарным специалистам хозяйств по вопросам, связанным с диагностикой и профилактикой вирусных болезней рыб;
- проведение независимых испытаний пищевой продукции объектов аквакультуры и кормов для рыб по показателям качества и безопасности, определяющим степень соответствия их нормам и требованиям действующих нормативных документов;
- прогнозирование и оценка рисков возникновения и заноса на территорию РФ болезней гидробионтов;
- участие в разработке программ и нормативных документов по профилактике и ликвидации инфекционных болезней объектов аквакультуры, осуществление функций центра по научному и методическому обеспечению деятельности Россельхознадзора, его территориальных управлений и подведомственных ему организаций в отношении вирусных заболеваний рыб.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ДРУГИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- исследование проб патологического материала рыб на вирусы методом вирусыведения на культуре клеток;
- исследование проб патологического материала рыб на вирусы методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- бактериологическое и микологическое исследования патологического материала рыб с выделением и идентификацией выделенного возбудителя;
- оценка показателей безопасности и качества пищевой продукции из объектов аквакультуры и кормов для рыб: определение токсичных элементов (кадмий, мышьяк, свинец, ртуть), микотоксинов (афлатоксины, ЗОН, ДОН, охратоксин А, Т-2 токсин), остаточных количеств пестицидов (ХОС, ФОС), полихлорированных бифенилов (ПХБ), бенз(а)пирена, антибактериальных, лекарственных и ветеринарных препаратов, гормональных веществ, вредных примесей, ГМО, зараженности и загрязненности вредителями; определение макро- и микроэлементов, витаминов (группы В, А), массовой доли сырой клетчатки, сырого жира, сырого протеина, сырой золы, влаги, мочевины, фосфора, нитратов, нитритов, хлоридов, аминокислотного состава кормов и т. д.;
- исследование воды по микробиологическим и химическим показателям.

ФГБУ «ВНИИЗЖ» аккредитовано Федеральной службой по аккредитации (Росаккредитация) на соответствие требованиям ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

Референтная лаборатория по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» ежегодно принимает участие в международных межлабораторных сличительных испытаниях (МСИ), организованных референтной лабораторией ЕС по болезням рыб и ракообразных «Национальный институт водных ресурсов», (г. Конгенс-Льунгбю, Дания), аккредитованной в соответствии с международными требованиями.

По вопросам проведения исследований обращаться по тел.: 8 (4922) 26-15-25 (доб. 21-35 и 20-65)