



ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ
ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

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

VETERINARY SCIENCE TODAY

СЕНТЯБРЬ | SEPTEMBER

№3 [34] 2020

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

ЛИКВИДИРОВАТЬ БЕШЕНСТВО В РОССИИ к 2030 году

Опыт мероприятий по предупреждению заноса и распространения бешенства на длительно благополучной территории (по материалам Иркутской области)

стр. 154

Оценка эффективности противоэпизоотических мероприятий против бешенства, осуществляемых в Российской Федерации

стр. 162



Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2

стр. 186

Микробиоценоз желчи у кошек при остром холангио гепатите

стр. 193

Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В

стр. 205

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

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

ВЕТЕРИНАРИЯ СЕГОДНЯ

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ
ЖУРНАЛ

VETERINARY SCIENCE TODAY

СЕНТЯБРЬ | SEPTEMBER №3 [34] 2020

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

Издается с 2012 года, выходит 4 раза в год
Published 4 times a year since 2012

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)

Главный редактор: Метлин Артем Евгеньевич, доктор ветеринарных наук, первый заместитель директора ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: metlin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-4283-0171
тел.: 8 (4922) 26-06-14

Шеф-редактор: Юлия Мелано, советник Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (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: Artem Ye. Metlin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), First Deputy Director, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: metlin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-4283-0171
Tel.: 8 (4922) 26-06-14

Editorial Director: Julia Melano, Advisor to the Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoznadzor), Moscow, Russia, e-mail: j.melano@ya.ru

Executive Editors:

Tatiana Nikeshina, 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 Базарцэрэн – доктор ветеринарных наук, Институт ветеринарной медицины, г. Улан-Батор, Монголия

Бучацкий Л. П. – доктор биологических наук, профессор, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев, Украина

Готов А. Г. – доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБНУ «Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий» 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. П. 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

Ломако Ю. В. – кандидат ветеринарных наук, доцент, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского», 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. П. 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

Судейманов 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 Bazartsuren – PhD/DVM, Institute of Veterinary Medicine, Ulan Bator, Mongolia

Leonid P. Buchatsky – Doctor of Science (Biology), Professor, Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences, 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. Vyshel'sky, Minsk, Belarus; ORCID ID 0000-0002-9611-8286

Natalia V. Mishchenko – 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

Ответственный секретарь: Елена Гусева

Корректор: Ирина Зверева

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.

Design and composition: Maria Bondar

Executive secretary: Elena Guseva

Proof-reader: Irina Zvereva

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 РИНЦ, каталог журналов открытого доступа DOAJ, а также в список журналов, входящих в базу данных RSCI на платформе Web of Science, и международную базу данных EBSCO. Электронные версии журнала размещаются в полнотекстовом формате на сайте Научной электронной библиотеки (НЭБ) 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, Directory of Open Access Journals DOAJ, as well as in the Web of Science RSCI database and in the international database of EBSCO. 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, ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия; ORCID ID 0000-0002-8464-6380

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, ФГАУ 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

Русалеев В. С. – доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия; ORCID ID 0000-0002-4972-6326

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, Заместитель Премьер-министра Республики Беларусь, 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; ORCID ID 0000-0002-6177-8858

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

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; ORCID ID 0000-0002-4972-6326

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, Deputy Prime Minister of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

Ilya A. Chvala – Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director 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; ORCID ID 0000-0002-6177-8858

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. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
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: 000 "Veinard", 129626, Moscow, 102 Prospect Mira, bld. 31, office 12

Адрес редакции: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Типография: ООО «ГРАН ПРИ», 152900, Ярославская область, г. Рыбинск, ул. Луговая, 7
Подписано в печать 9 сентября 2020 года
Дата выхода в свет: 21 сентября 2020 года

Editorial Board Office: 600901, Vladimir, Yur'evets, FGBI "ARRIAH"
Printing Office: 000 "Grand Prix", 152900, Yaroslavl Oblast, Rybinsk, Lugovaya str., 7
Approved for print: September 09, 2020
Issued: September 21, 2020

16+

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БЕШЕНСТВО ЖИВОТНЫХ

154 Опыт мероприятий по предупреждению заноса и распространения бешенства на длительно благополучной территории (по материалам Иркутской области)
И. В. Мельцов, А. М. Аблов, Е. Н. Школьникова, М. Е. Коплик, П. А. Минченко, Т. В. Десяткова, И. Д. Зарва, А. Д. Ботвинкин, А. Е. Метлин

162 Оценка эффективности противозооитических мероприятий против бешенства, осуществляемых в Российской Федерации
С. В. Щербинин, Т. В. Вадопалас, Ф. И. Коренной, К. А. Блохина, А. К. Караулов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ КРС

170 Оптимизация параметров культивирования вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019»
В. В. Кирпиченко, С. В. Кононова, И. Н. Шумилова, А. А. Нестеров, М. В. Туркова, Е. А. Бухон, Д. В. Роменская, А. В. Спрыгин, Б. Л. Манин, О. П. Бьядовская

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

179 Базовая скорость репродукции для некоторых инфекционных заболеваний свиней: оценка необходимого уровня вакцинации или депопуляции восприимчивого поголовья животных
В. М. Гуленкин, Ф. И. Коренной, А. К. Караулов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ ПТИЦ

186 Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2
П. Б. Акшалова, А. В. Андриясов, Л. О. Щербакова, С. Н. Колосов, Н. Г. Зиняков, И. А. Чвала, Д. Б. Андрейчук

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БОЛЕЗНИ МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

193 Микробиоценоз желчи у кошек при остром холангио гепатите
А. А. Руденко, Д. С. Усенко, А. Ф. Руденко

199 Отравление кота ложными сморчками
Erdem Gülersoy, Tuğçe Manolya Baş, Mahmut Ok

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

205 Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы B
М. С. Фирсова, В. А. Евграфова, А. В. Потехин, Р. В. Яшин, О. В. Прунтова, В. С. Русалеев

213 Микотоксикологический мониторинг.
Сообщение 3. Кормовая продукция от переработки зернового сырья
Г. П. Кононенко, А. А. Буркин, Е. В. Зотова

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | БИОТЕХНОЛОГИЯ

220 Опосредованное определение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии при сравнении графиков второй производной для кривых ОТ-ПЦР-РВ
М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, В. А. Стариков, Д. А. Лозовой, А. В. Борисов

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

228 Исследование лечебного воздействия вод термальных источников провинции Афьон на экспериментально индуцированную жировую дистрофию печени у мышей
Bülent Elitok, Ibrahim Kışlalioglu, Yavuz Ulusoy, Bahadır Kilingç

РЕЦЕНЗИИ

239 Рецензия на монографию «Вирусные болезни осетров и лососей»
Л. П. Бучачкий, Ю. П. Рудь, Н. Н. Матвиенко. Киев: ДИА, 2020. 240 с. ISBN 978-617-7785-10-0

НОВОСТИ

240 Проведение Всемирного дня борьбы с бешенством в России
Будимир Плавшич

242 ПРЕСС-РЕЛИЗ ФАО:
Онлайн-обучение помогает подготовить ветеринаров для борьбы с заразным узелковым дерматитом

НЕКРОЛОГ

244 В память о Виталии Александровиче Сергееве

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES | ANIMAL RABIES

154 Lessons learnt from measures taken to prevent rabies introduction and spread into a long rabies free territory (case study of the Irkutsk Oblast)
I. V. Meltsov, A. M. Ablov, E. N. Shkolnikova, M. E. Koplík, P. A. Minchenko, T. V. Desyatova, I. D. Zarva, A. D. Botvinkin, A. Ye. Metlin

162 Evaluation of rabies control measure effectiveness in the Russian Federation
S. V. Shcherbinin, T. V. Vadopalas, F. I. Korennoy, K. A. Blokhina, A. K. Karaulov

ORIGINAL ARTICLES | BOVINE DISEASES

170 Optimization of cultivation parameters for bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019
V. V. Kirpichenko, S. V. Kononova, I. N. Shumilova, A. A. Nesterov, M. V. Turkova, Ye. A. Bukhon, D. V. Romenskaya, A. V. Sprygin, B. L. Manin, O. P. Byadovskaya

ORIGINAL ARTICLES | PORCINE DISEASES

179 Basic reproduction number for certain infectious porcine diseases: estimation of required level of vaccination or depopulation of susceptible animals
V. M. Gulenkin, F. I. Korennoy, A. K. Karaulov

ORIGINAL ARTICLES | AVIAN DISEASES

186 Development of real-time RT-PCR for N2 subtype avian influenza RNA-virus detection
P. B. Akshalova, A. V. Andriyosov, L. O. Scherbakova, S. N. Kolosov, N. G. Zinyakov, I. A. Chvala, D. B. Andreychuk

ORIGINAL ARTICLES | DISEASES OF SMALL PETS

193 Bile microbiocenosis in cats suffering from acute cholangiohepatitis
A. A. Rudenko, D. S. Usenko, A. F. Rudenko

199 False morel poisoning in a cat
Erdem Gülersoy, Tuğçe Manolya Baş, Mahmut Ok

ORIGINAL ARTICLES | VETERINARY MICROBIOLOGY

205 Immunogenic characteristics of *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) isolates and strains
M. S. Firsova, V. A. Yevgrafova, A. V. Potekhin, R. V. Yashin, O. V. Pruntova, V. S. Russaleyev

213 Mycotoxicological monitoring.
Part 3. Feedstuffs from raw grain processing
G. P. Kononenko, A. A. Burkin, Ye. V. Zotova

ORIGINAL ARTICLES | BIOTECHNOLOGY

220 Indirect determination of FMDV 146S component concentration in non-inactivated suspension by comparison of graphs of the second derivative for real-time RT-PCR curves
M. I. Doronin, D. V. Mikhailishin, V. A. Starikov, D. A. Lozovoy, A. V. Borisov

ORIGINAL ARTICLES | GENERAL ISSUES

228 Investigation of the healing effects of Afyon Province hot spring waters on experimentally-induced fatty liver in mice
Bülent Elitok, Ibrahim Kışlalioglu, Yavuz Ulusoy, Bahadır Kilingç

PEER REVIEWS

239 Peer-review of monograph "Viral Diseases of Sturgeons and Salmon"
L. P. Buchatsky, Yu. P. Rud, N. N. Matvienko. K.: DIA, 2020. 240 p. ISBN 978-617-7785-10-0

NEWS

240 World Rabies Day in Russia
Budimir Plavsic

242 FAO PRESS RELEASE:
Online training helps veterinarians in Lumpy skin disease preparedness

OBITUARY

244 In memory of Vitaly Alexandrovich Sergeev

От главного редактора «Ветеринария сегодня»



Уважаемые читатели, перед вами номер журнала, посвященный Всемирному дню борьбы с бешенством, который отмечается 28 сентября. Этот день был учрежден в 2007 г. по инициативе Глобального альянса по контролю бешенства (GARC) при поддержке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Датой празднования был выбран день смерти Луи Пастера (28.09.1895) – микробиолога, одного из создателей вакцины против бешенства.

Всемирный день борьбы с бешенством призван привлечь внимание к проблеме распространения заболевания и повысить информированность населения о его последствиях.

Бешенство – одно из древнейших и самых опасных инфекционных заболеваний человека и животных. Оно проявляется нарушением функции центральной нервной системы, сопровождается параличами и энцефаломиелитом, характеризуется абсолютной летальностью. По оценке ВОЗ, оно входит в пятерку зоонозов, наносящих наибольший экономический ущерб, и представляет постоянную угрозу для жизни человека и животных.

Несмотря на успешное искоренение этого заболевания в некоторых европейских странах, ситуация на территории многих государств Евразии, Африки и Америки остается сложной. Ежегодно от бешенства в мире умирают около 70 000 человек, главным образом это дети из развивающихся стран.

В рамках глобальной инициативы ФАО, ВОЗ и МЭБ об элиминации переносимого собаками бешенства сре-

ди людей к 2030 г. России, как члену этих международных организаций, предстоит предпринять ряд шагов в научно-исследовательском, информационно-методическом, законодательном и практическом направлениях. Существенную поддержку данное направление приобрело благодаря решению Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ от 12 мая 2016 г., в котором ФГБУ «ВНИИЗЖ» было поручено подготовить проект «Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Комплекс совместных действий разработан с учетом предложений ветеринарных служб государств – участников СНГ, опыта реализации программ по борьбе с бешенством животных в странах Европейского союза, США и Канады и направлен на снижение распространения на территориях государств – участников СНГ вспышек болезни и сведение к минимуму ущерба от заболевания.

По оценке ВОЗ, бешенство входит в пятерку зоонозов, наносящих наибольший экономический ущерб, и представляет постоянную угрозу для жизни человека и животных

Только совместными усилиями международного сообщества можно искоренить это опасное заболевание. Важно помнить, что излечить бешенство нельзя, но мы можем эффективно его профилактировать!

Главный редактор
доктор ветеринарных наук
Артем Евгеньевич Метлин

Опыт мероприятий по предупреждению заноса и распространения бешенства на длительно благополучной территории (по материалам Иркутской области)

И. В. Мельцов¹, А. М. Аблов², Е. Н. Школьников³, М. Е. Коплик⁴, П. А. Минченко⁵, Т. В. Десятова⁶, И. Д. Зарва⁷, А. Д. Ботвинкин⁸, А. Е. Метлин⁹

¹ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А. А. Ежевского» (ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ), г. Иркутск, Россия

^{2,3,4} ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория» (ФГБУ «Иркутская МВЛ»), г. Иркутск, Россия

⁵ Министерство лесного комплекса Иркутской области, г. Иркутск, Россия

⁶ ФГБУ «Объединенная дирекция государственного природного заповедника «Байкало-Ленский» и Прибайкальского национального парка» (ФГБУ «Заповедное Прибайкалье»), г. Иркутск, Россия

^{7,8} ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России), г. Иркутск, Россия

⁹ ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0001-8566-7004, e-mail: ivanmeltsov@mail.ru

² e-mail: imvl2004@mail.ru

³ e-mail: imvl2004@mail.ru

⁴ e-mail: imvl2004@mail.ru

⁵ e-mail: pawel.minchenko@yandex.ru

⁶ e-mail: desyatovav@gmail.com

⁷ ORCID 0000-0002-4225-5998, e-mail: ivan_zarva@mail.ru

⁸ ORCID 0000-0002-0920-1330, e-mail: botvinkin_ismu@mail.ru

⁹ ORCID 0000-0002-4283-0171, e-mail: metlin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Значительная часть территории Российской Федерации эндемична по бешенству, что в настоящее время обусловлено активностью природных очагов инфекции. Наиболее высокие показатели заболеваемости животных отмечаются в центральных и южных регионах европейской части России и на юге Западной Сибири. Иркутская область относится к числу немногих территорий нашей страны, свободных от бешенства на протяжении нескольких десятилетий. Целью исследования был анализ обстоятельств, способствовавших сохранению статуса благополучной по бешенству территории. Проведено ретроспективное изучение архивных и опубликованных ранее данных о регистрации бешенства среди людей и животных в Иркутской области с 1954 г. Эпизоотии городского типа в регионе прекратились в 1970-е годы. Спорадические случаи заболевания собак в 1976 г. и позднее, вероятно, могли быть завозными или возникать в результате заражения от летучих мышей. Не исключено также, что могли иметь место ошибки диагностики. Бешенство среди лисиц регистрируется в соседних с Иркутской областью субъектах – Красноярском крае и Республике Бурятия. Сделано предположение о том, что, в случае заноса инфекции, могут быть поражены сельскохозяйственные районы лесостепного Приангарья с высокой численностью лисицы. Длительному благополучию Иркутской области по бешенству животных способствует относительная географическая изоляция этой части ее территории. Экологическим барьером служат обширные пространства горной тайги с низкой численностью лисицы. В 2007–2009 и 2019 гг. проводилась барьерная оральная вакцинация лисиц на границе с Красноярским краем и на западном побережье Байкала. Усилены мероприятия по вакцинации собак и кошек против бешенства. Систематически проводится активный вирусологический мониторинг. В статье приведены картограммы плотности населения лисицы и волка с обозначением участков проведения оральной вакцинации диких плотоядных.

Ключевые слова: бешенство, свободная от бешенства территория, барьерная оральная вакцинация, вакцинация собак и кошек.

Благодарности: Работа выполнена при поддержке службы ветеринарии Иркутской области в рамках подпрограммы «Обеспечение деятельности в области ветеринарии» на 2019–2024 годы, являющейся приложением к государственной программе «Развитие сельского хозяйства и регулирование рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2019–2024 годы» (постановление Правительства Иркутской области от 26.10.2018 № 772-пп с изменениями на 07.05.2020).

Для цитирования: Мельцов И. В., Аблов А. М., Школьников Е. Н., Коплик М. Е., Минченко П. А., Десятова Т. В., Зарва И. Д., Ботвинкин А. Д., Метлин А. Е. Опыт мероприятий по предупреждению заноса и распространения бешенства на длительно благополучной территории (по материалам Иркутской области). *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 154–161. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-154-161.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Мельцов Иван Владимирович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры специальных ветеринарных дисциплин ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ, 664038, Россия, Иркутская обл., Иркутский р-н, п. Молодежный, e-mail: ivanmeltsov@mail.ru.

UDC 619:616.98:578.824.11:636.7:636.8:616-036.22:616-085.371(571.53)

Lessons learnt from measures taken to prevent rabies introduction and spread into a long rabies free territory (case study of the Irkutsk Oblast)

I. V. Meltsov¹, A. M. Ablov², E. N. Shkolnikova³, M. E. Koplík⁴, P. A. Minchenko⁵, T. V. Desyatova⁶, I. D. Zarva⁷, A. D. Botvinkin⁸, A. Ye. Metlin⁹

¹ Federal State Budgetary Education of Higher Education “Irkutsk State Agricultural University named after A. A. Ezhevsky” (FSBEI HE Irkutsk SAU), Irkutsk, Russia

^{2,3,4} Irkutsk Interblast Veterinary Laboratory, Irkutsk, Russia

⁵ Irkutsk Oblast Ministry of Forestry, Irkutsk, Russia

⁶ FGBI “Associate Directorate of the State Nature Reserve “Baikal-Lena” and “Cisbaikalia Natural Park” (FGBI “Rezerved Cisbaikalia”), Irkutsk, Russia

^{7,8} Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Irkutsk State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (FSBEI HE ISMU MOH Russia), Irkutsk, Russia

⁹ FGBI “Federal Centre for Animal Health” (FGBI “ARRIAH”), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0001-8566-7004, e-mail: ivanmeltsov@mail.ru

² e-mail: imvl2004@mail.ru

³ e-mail: imvl2004@mail.ru

⁴ e-mail: imvl2004@mail.ru

⁵ e-mail: pawel.minchencko@yandex.ru

⁶ e-mail: desyatovatv@gmail.com

⁷ ORCID 0000-0002-4225-5998, e-mail: ivan_zarva@mail.ru

⁸ ORCID 0000-0002-0920-1330, e-mail: botvinkin_ismu@mail.ru

⁹ ORCID 0000-0002-4283-0171, e-mail: metlin@arriah.ru

SUMMARY

Rabies is endemic on the considerable part of the Russian Federation, and it is associated with current natural outbreaks of the infection. The highest animal morbidity rates are reported in the central and southern regions of the European part of Russia and in the southern part of Western Siberia. The Irkutsk Oblast is among the few regions of our country, which are rabies free for several decades. The research was aimed at the analysis of factors aiding to the maintenance of the rabies free status of the region. Retrospective study of archive and previously published reports on human and animal rabies cases in the Irkutsk Oblast starting from 1954 was performed. Epidemics of urban rabies ceased in the region in 1970s. Sporadic rabies cases in dogs, reported in 1976 and later, could be imported or could result from the infection from bats. Diagnostic errors were also possible. Rabies is reported in foxes in the Subjects bordering the Irkutsk Oblast: Krasnoyarsk Krai and Republic of Buryatia. It is supposed that in case of the infection introduction the forest-steppe agricultural areas near the Angara River are likely to be affected due to high population of foxes. Relative geographic isolation of the Irkutsk Oblast favors to the long animal rabies freedom of this territory. The vast area of mountain taiga with low fox population serves as an ecological barrier. In 2007–2009 and in 2019, barrier oral vaccination was carried out along the border with the Krasnoyarsk Krai and on the west coast of Baikal Lake. Measures for anti-rabies vaccination of dogs and cats were intensified. Active virological monitoring is performed on a regular basis. The paper demonstrates cartograms of fox and wolf population density along with designation of sites, where oral vaccination of wild carnivores was performed.

Key words: rabies, rabies-free territory, oral barrier vaccination, vaccination of dogs and cats.

Acknowledgements: The research was supported by the Irkutsk Oblast Veterinary Service under the subprogram “Facilitating activities in the veterinary area” for 2019–2024, which is an application to the State Program “Development of agriculture and regulation of markets of agricultural products, raw materials and food in 2019–2024” (Irkutsk Oblast Government Decree of October 26, 2018 No. 772-pp, as amended on May 07, 2020).

For citation: Meltsov I. V., Ablov A. M., Shkolnikova E. N., Koplík M. E., Minchenko P. A., Desyatova T. V., Zarva I. D., Botvinkin A. D., Metlin A. Ye. Lessons learnt from measures taken to prevent rabies introduction and spread into a long rabies free territory (case study of the Irkutsk Oblast). *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 154–161. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-154-161.

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

For correspondence: Ivan V. Meltsov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Chair of special veterinary disciplines, FSBEI HE Irkutsk SAU, 664038, Russia, Irkutsk Oblast, Irkutsk Raion, Molodezhny set., e-mail: ivanmeltsov@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство входит в число опасных зоонозов с наибольшей социальной и экономической значимостью [1]. Ущерб от этой смертельной инфекции обусловлен потерями поголовья сельскохозяйственных

и промысловых животных, значительными затратами на проведение противозoonотических мероприятий, включая вакцинацию животных, диагностические исследования, а также профилактическую и постэкспозиционную вакцинацию населения. Даже при хорошо

организованной работе по надзору за бешенством сохраняется риск возникновения смертельных заболеваний среди людей. Поэтому для недопущения заноса инфекции на благополучные по бешенству территории должны проводиться профилактические мероприятия. Эти обстоятельства определяют стратегию и тактику борьбы с бешенством на территориях с различной эпизоотической обстановкой [2–4].

Значительная часть территории Российской Федерации эндемична по бешенству, что в настоящее время обусловлено активностью природных очагов инфекции. Наиболее высокие показатели заболеваемости животных отмечаются в центральных и южных регионах европейской части России и на юге Западной Сибири. В то же время некоторые субъекты Российской Федерации остаются свободными от заболевания на протяжении многих лет [5–7]. Для бешенства характерны периодически возникающие обострения эпизоотической ситуации, которые сопровождаются изменением границ нозоареала. Например, в начале текущего столетия эпизоотии среди лисиц впервые выявлены в ряде регионов Восточной Сибири. В результате на ранее благополучных территориях (юге Красноярского края, в республиках Хакасия и Бурятия, Забайкальском крае) бешенство среди диких и домашних животных регистрируется уже на протяжении ряда лет [8–11]. Единственным благополучным по бешенству субъектом в Восточной Сибири остается Иркутская область.

Цель исследования – анализ обстоятельств, способствовавших сохранению статуса благополучной по бешенству территории на фоне эпизоотий, поразивших соседние регионы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ архивных и опубликованных ранее данных о регистрации бешенства среди людей и животных в Иркутской области с 1954 г. [5, 12–15]. Спорадические случаи, отмеченные в статистических сводках после 1975 г., подвергнуты проверке.

Профилактические и надзорные мероприятия в современный период представлены на основании данных, накопленных ветеринарной службой Иркутской области. Обработаны результаты вирусологического мониторинга за 2007–2019 гг. Головной мозг диких животных, добытых в порядке охотничьего промысла, а также домашних животных с подозрением на бешенство, больших или найденных мертвыми ($n = 1002$) исследовали в соответствии с ГОСТ 26075-2013 «Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства».

Сведения о вакцинации собак и кошек против бешенства приведены по данным ведомственного учета и отчетности по формам № 1-вет и № 1-вет А. Для оценки численности собак и кошек, имеющих владельцев, а также безнадзорных животных использованы материалы областной станции по борьбе с болезнями животных за 2018–2019 гг. [16].

Барьерная оральная вакцинация лисиц в 2007–2009 гг. проводилась с использованием автомобилей и квадроциклов вакциной «Оралрабивак» (ФКП «Щелковский биокорбинат», Россия); в 2019 г. – вакциной «Рабистав» (ФКП «Ставропольская биофабрика», Россия) в соответствии с инструкциями по применению. Динамика численности и плотность населения лисицы и волка проанализированы на основании данных зим-

них маршрутных учетов, которые проводились в соответствии с методическими указаниями, утвержденными Приказом Минприроды России от 11.01.2012 № 1. Учетные данные сопоставлены с официально зарегистрированными объемами добычи этих видов.

Картографирование проведено на основе электронной ландшафтно-географической карты Natural Earth с использованием программы QGIS 3.2.1. Неблагополучные по бешенству территории в соседних субъектах Российской Федерации обозначены на карте на основании ранее опубликованных данных за 2002–2019 гг. [8, 9, 15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В середине прошлого века в Иркутской области, как и во многих других регионах России, свирепствовали эпизоотии бешенства городского типа. Об этом свидетельствует структура заболеваемости. С 1954 по 1970 г. зарегистрировано 654 случая бешенства у животных (78,7% – собаки, 17,7% – сельскохозяйственные животные, 3,8% – кошки). Заболеваний бешенством диких животных не отмечено. За этот же период зарегистрировано 29 случаев бешенства среди людей с максимумом в 1962 г. В разных публикациях сообщалось, что в середине XX века в Иркутской области погибло от бешенства 36 или 37 человек [12, 14]. Во всех случаях источником заражения были домашние животные. Отмечено два эпизоотических подъема – в середине 1950-х и начале 1960-х гг. После 1963 г. заболеваемость неуклонно снижалась (см. таблицу). Единичные случаи бешенства у животных в статистических сводках приведены после 1970 г.: в 1976 г. – 3 случая, в 1998 г. – 1. В текущем столетии также отмечались случаи подозрения на бешенство у животных на основании клинических проявлений болезни и сомнительных результатов люминесцентной микроскопии. Однако при их расследовании и проведении экспертных и лабораторных исследований диагноз не подтверждался. Например, в 2016 г. в сети Интернет было опубликовано сообщение о нападении волка на человека в Усть-Илимском районе, но при расследовании оказалось, что укусы были нанесены собакой, у которой бешенство лабораторно не подтвердилось. С 2007 по 2019 г. в региональной ветеринарной лаборатории исследован материал от 433 лисиц, 115 волков, 208 других видов диких животных, 228 собак и кошек, 16 синантропных грызунов, 2 сельскохозяйственных животных. Вирусологический мониторинг не выявил ни одного случая заболевания бешенством. Таким образом, на протяжении последних 50 лет эпизоотий бешенства в Иркутской области не наблюдалось. Спорадические случаи у собак в 1976 г. могли быть завозными или возникать в результате заражения от летучих мышей. Известно, что в Восточной Сибири среди рукокрылых циркулирует лиссавирус Иркут [17]. Не исключено также, что могли иметь место ошибки диагностики. Так, не подтвердился случай у кошки в Иркутске, описанный в 1998 г. [13].

После 2002 г. ситуация по бешенству в субъектах Российской Федерации, граничащих с Иркутской областью, кардинально изменилась. С этого времени эпизоотии среди лисиц с вовлечением домашних и сельскохозяйственных животных не прекращаются в островных лесостепях на юге Красноярского края и Республики Хакасия. В 2011–2019 гг. вспышки лисьего бешенства выявлены в Республике Бурятия и Забайкальском крае.

Таблица

Динамика заболеваемости животных и людей бешенством в Иркутской области за 1954–1970 гг. (архивные данные)

Table

History of animal and human rabies morbidity in the Irkutsk Oblast in 1954–1970 (archive data)

Категории	Годы																	
	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971
Животные	173	104	52	79	15	9	19	5	46	71	50	11	1	11	7	0	1	0
Люди*	0	2	0	2	1	1	2	2	9	4	4	1	3	0	0	0	0	0

* Случаи заболевания людей приведены по дате заражения (Human cases are reported by the date of infection).

Периодически регистрируются вспышки в Республике Тыва [5, 8–11, 18]. Наиболее географически близкие к Иркутской области случаи бешенства в Красноярском крае зарегистрированы в Канской лесостепи и долине р. Ангары всего в 50–60 км от административной границы [9]. В Республике Бурятия бешенство проникло на север по долине р. Селенги и ее притокам до г. Улан-Удэ (примерно 150 км по прямой до Ольхонского района Иркутской области) [8]. Это послужило основанием для оценки возможности заноса бешенства в Иркутскую область и проведения дополнительных профилактических мероприятий.

Численность лисицы в Иркутской области в период эпизоотий бешенства в 1950–1965 гг., судя по заготовкам пушнины, характеризовалась слабыми темпами роста с колебаниями в пределах 1,4–2,7 тыс. шкурок в год. Это еще раз подтверждает, что эпизоотии среди лисиц в тот период не было. Так, например, в Республике Бурятия численность лисицы резко сократилась после заноса вируса бешенства в 2017 г. [19]. Максимальное количество волков (около 400 экз.) добыто в 1950 г. с постепенным 4-кратным снижением к 1965 г. В более поздний период (примерно с 1969 по 2000 г.) достоверные сведения о численности лисицы и волка отсутствуют в силу ряда социально-экономических причин. После 2000 г. имеются данные зимних маршрутных учетов, которые указывают на рост численности волка и особенно лисицы (рис. 1). По-видимому, основным фактором современного роста численности лисицы является снижение охотничьего пресса. мех лисицы не пользуется спросом, и в настоящее время она добывается преимущественно охотниками-любителями попутно при охоте на копытных. В среднем за 2011–2019 гг. добывалось 489 особей в год – около 3% от учетной численности вида. Для волка эти показатели составили 232 особи, 4,8% соответственно.

В федеральных сводках учета охотничьих ресурсов самая высокая численность лисицы в Восточной Сибири зарегистрирована именно в Иркутской области [20, 21]. Наиболее высокая плотность популяции лисицы наблюдается в пределах Иркутско-Черемховской равнины, для которой характерны лесостепные антропогенно трансформированные ландшафты. Средние значения плотности этого вида отмечены в Эхирит-Булагатской лесостепи, а также в Тайшетском и Чунском районах, граничащих с Красноярским краем. Наиболее высокие показатели плотности популяции волка наблюдаются в таежных районах (рис. 2). Сравнение данных по Иркутской области и Республике Бурятия, где бешенство после заноса из Монголии непрерыв-

но регистрируется уже более трех лет [19], показывает, что средние параметры плотности популяции волка одинаковы, но средняя плотность популяции лисицы выше в Иркутской области. В прилегающих к Байкалу таежных местообитаниях плотность популяции лисицы оценивается как низкая. Однако в связи с высокой численностью диких копытных плотность популяции волка здесь поддерживается на высоком уровне (рис. 2). Лисица на острове Ольхон немногочисленна и питается преимущественно вблизи туристических баз и дорог. Более благоприятные условия для обитания лисицы имеются в Тажеранской степи, но плотность ее популяции и здесь не достигает высоких значений. На Ольхоне постоянно обитает стая волков численностью до 8–11 особей. Известны редкие случаи перехода волков по льду Байкала с восточного берега на западный. По данным учетов, на территории Прибайкальского национального парка и Байкало-Ленского заповедника в 2014–2019 гг. численность лисицы и волка оценивается цифрами одного порядка (волк – 36–101, лисица – 29–116 особей). Таким образом, существует вероятность заноса вируса бешенства из неблагоприятных районов Республики Бурятия на особо охраняемые природные территории, расположенные

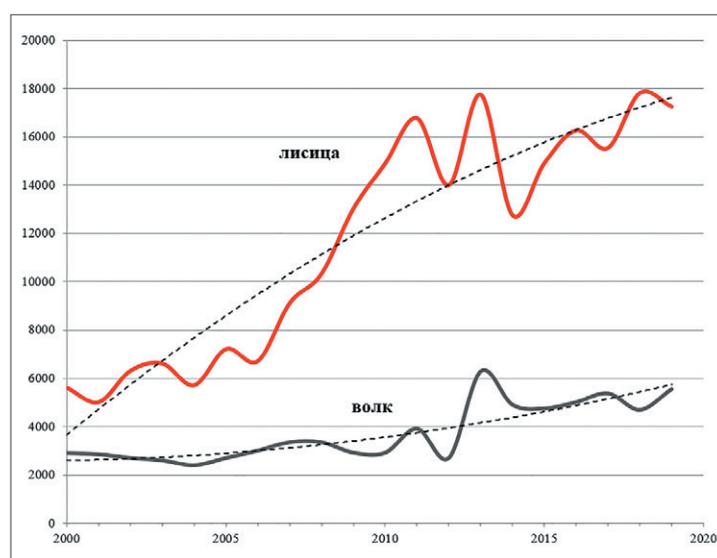


Рис. 1. Динамика численности лисицы и волка в Иркутской области по данным зимних маршрутных учетов (число особей, 2000–2019 гг.)

Fig. 1. Dynamics of fox and wolf population numbers in the Irkutsk Oblast by winter census data (number of animals, 2000–2019)

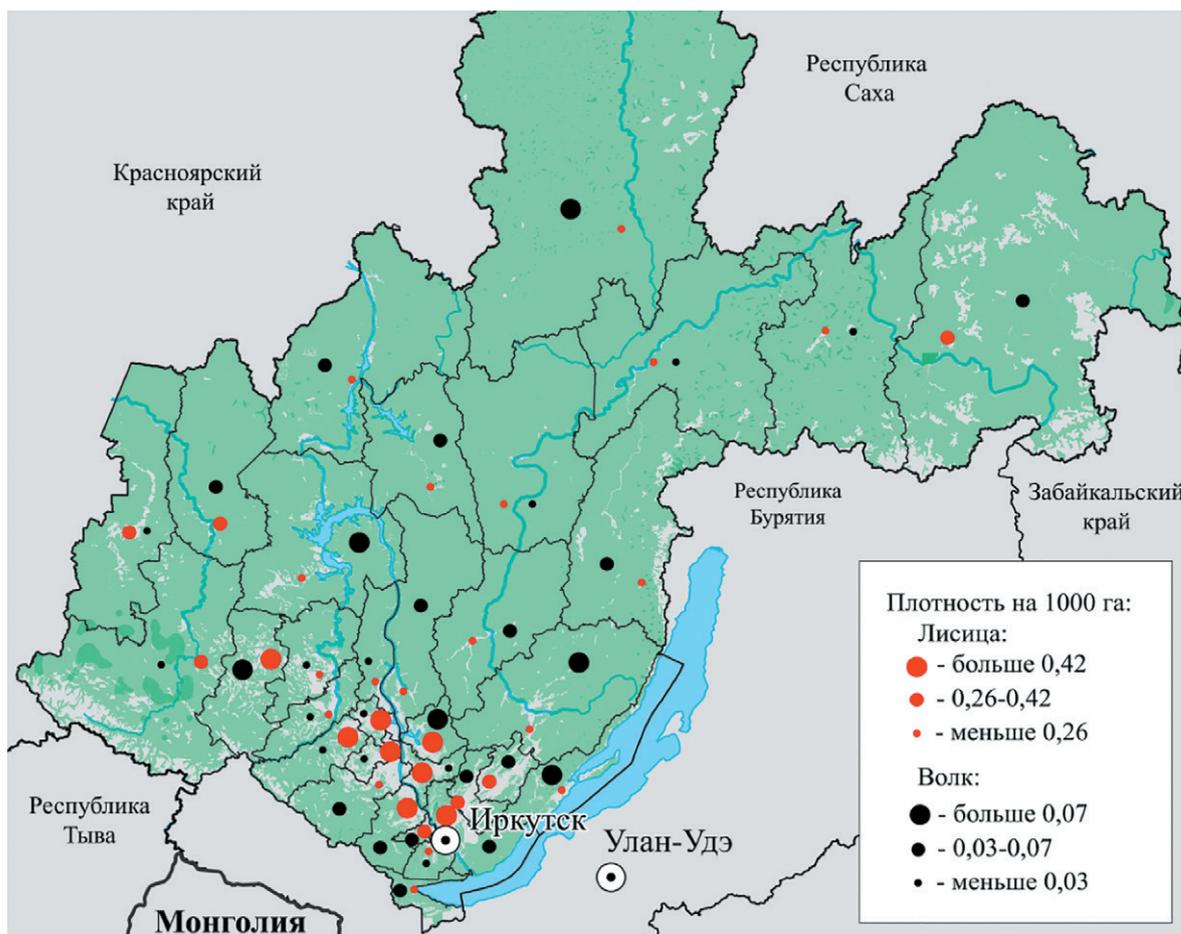


Рис. 2. Плотность населения лисицы и волка в Иркутской области по данным зимних маршрутных учетов (средние данные за 2015–2019 гг. на 1000 га охотничьих угодий; светлые участки на карте – безлесные территории)

Fig. 2. Density of fox and wolf population in the Irkutsk Oblast by winter census data (average data for 2015–2019 per 1,000 ha of hunting reserves; light colored areas on the map – forest-free territories)

вдоль западного побережья Байкала, но условия для дальнейшего распространения бешенства среди диких животных здесь минимальны.

В связи с угрозой заноса бешенства из Красноярского края с осени 2007 г. в течение трех лет проводилась барьерная оральная вакцинация лисиц в Нижнеудинском, Тайшетском, Чунском и Усть-Илимском районах в нарастающих объемах: 2007 г. – 7,3; 2008 г. – 37,28; 2009 г. – 118,0 тыс. доз. Раскладку вакцины проводили в полосе шириной до 50 км вдоль административной границы. Работы по формированию буферной зоны возобновлены в 2019 г.: в Тайшетском районе на приграничных с Красноярским краем территориях использовано 17 тыс. доз; на юге Иркутской области в Ольхонском районе на острове Ольхон и на западном побережье Байкала распределено 3 тыс. доз (рис. 3). При выборе участков для раскладки вакцины принимали во внимание ландшафтные особенности, определяющие возможность обитания и миграций лисицы. В Приенисейской Сибири и Забайкалье бешенство распространялось преимущественно по долинам рек и межгорным лесостепным котловинам, которые освоены человеком [8–11]. Известно, что особенности рельефа в значительной степени определяли эффективность первых кампаний по оральной вакцинации лисиц против

бешенства в Центральной Европе [22, 23]. Иркутскую область отделяет от Красноярского края, Республики Тыва и Монголии горный узел Восточного Саяна с максимальными высотами более 3,3 тыс. м над уровнем моря. Отдельные хребты с высотами до 1–2 тыс. м (Бирюсинский, Гутарский, Яги) простираются на север почти до Тайшета. Наиболее вероятными путями распространения бешенства с запада могут быть территории, расположенные севернее – по ходу Транссибирской железнодорожной магистрали на отрезке Канск – Тайшет, а также долины рек Бирюса, Чуна и Ангара. На юге непреодолимым для естественных хозяев вируса бешенства барьером в летнее время служит Байкал. Однако в течение 3–4 месяцев в году после установления ледового покрова не исключены эпизоды миграции волков со стороны Республики Бурятия. Наименьшая ширина Байкала (около 30 км) – в створе рек Селенга и Бугульдейка. Хребты Хамар-Дабан и Прибайкальский также служат труднопреодолимым барьером для лисицы, защищаящим Иркутскую область с юга.

Другим направлением работы является предотвращение заноса вируса бешенства с домашними животными. Надзор за перемещением животных на общественном транспорте осуществляется в соответствии с приказом Министерства сельского хозяйства РФ

от 14.12.2016 № 635 и практически исключает ввоз невакцинированных животных. Однако существует проблема перевозок личным автотранспортом внутри региона. Например, на Байкал в Ольхонский район ежегодно приезжает более 100 тыс. человек, многие из которых привозят с собой собак, кошек, хорьков и других животных. Это повышает актуальность вакцинации домашних питомцев. Статистических данных по численности собак и кошек нет. По данным опроса, в сельской местности в каждом подворье содержится как минимум одна собака и кошка. В 2019 г. зарегистрировано 91,8 тыс. подворий, и на основании этих цифр планируются объемы вакцинации животных. Начиная с 2014 г. вакцинируется более 80 тыс. собак в год, кроме этого, резко возросло число вакцинируемых кошек (рис. 4).

В Иркутской области после прекращения регистрации бешенства ежегодно обращалось за медицинской помощью 3–4 тыс. человек после травм, нанесенных животными (160–200 на 100 тыс. населения), с тенденцией роста этого показателя. В разные годы от 30 до 77% из них получали прививки против бешенства [5, 24, 25]. Ветеринарное наблюдение в течение 10 дней проводи-

лось в установленном порядке за животными с известным владельцем, что составляет около 75% от общего количества обращений. Однако в четверти случаев повреждения были нанесены неизвестными животными, что предполагает проведение полного курса прививок пострадавшим людям. По официальным данным, в 2019 г. зарегистрировано 13 тыс. безнадзорных собак и кошек, около 10% приходится на областной центр. Из них отловлено и помещено в приюты 9855 голов. Около 50% этих животных после вакцинации, стерилизации и биркования (чипирования) были выпущены. Контроль за соблюдением правил содержания домашних животных и регулирование численности безнадзорных собак и кошек остаются трудноразрешимыми социальными проблемами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время вероятность заноса бешенства в Иркутскую область увеличилась в связи с неблагополучием соседних территорий. В случае заноса инфекции дикими животными ожидается, что в основном могут быть поражены сельскохозяйственные районы

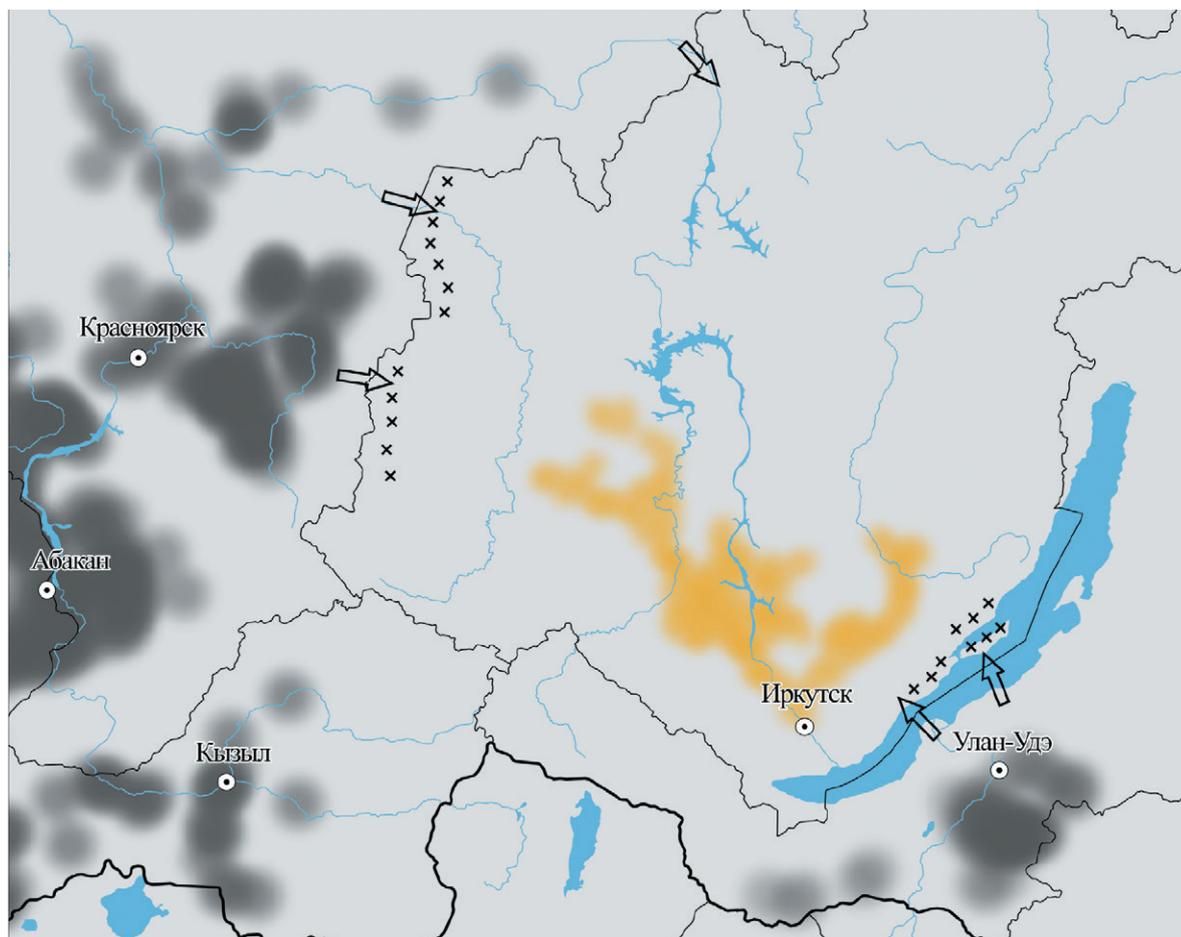


Рис. 3. Оценка возможности заноса и распространения бешенства в Иркутской области и районы проведения барьерной оральной вакцинации лисиц.

Легенда: крестики – места раскладки вакцины; серая заливка – неблагополучные по бешенству соседние территории; желтая заливка – лесостепные территории, благоприятные для распространения бешенства среди лисиц; стрелки – пути наиболее вероятного заноса бешенства дикими животными.

Fig. 3. Estimated probability of rabies introduction and spread in the Irkutsk Oblast and areas of barrier oral vaccination of foxes. Legend: crosses – sites of the vaccine distribution; gray paint – rabies infected neighboring territories; yellow paint – forest-steppe territories optimal for rabies spread in foxes; arrows – most probable routes of rabies introduction with wild animals.

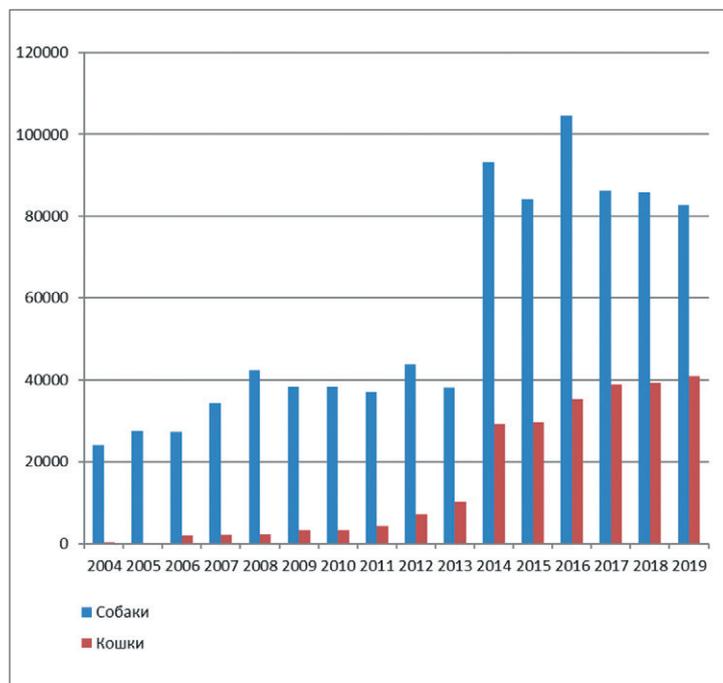


Рис. 4. Объемы вакцинации собак и кошек против бешенства в Иркутской области (2004–2019 гг.)

Fig. 4. Numbers of vaccinated dogs and cats in the Irkutsk Oblast (2004–2019)

лесостепного Приангарья с высокой численностью лисицы. Длительному благополучию Иркутской области способствует относительная географическая изоляция этой части ее территории. Актуальным остается продолжение барьерной оральной вакцинации лисиц и превентивных мероприятий в населенных пунктах в связи с участием России в реализации программы Всемирной организации здравоохранения «0–30», направленной на ликвидацию заболеваний людей бешенством после заражения от собак, и развитием туризма в Байкальском регионе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 3, 4, 7, 22, 23 см. REFERENCES)

- Метлин А. Е. Комплекс средств и методов диагностики и борьбы с бешенством: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Казань; 2018. 47 с.
- Полещук Е. М., Сидоров Г. Н., Нашатырева Д. Н., Градобоева Е. А., Пакскина Н. Д., Попова И. В. Бешенство в Российской Федерации. *Информационно-аналитический бюллетень*. Омск: Издательский центр КАН; 2019. 110 с. eLIBRARY ID: 41024936.
- Шабейкин А. А., Зайкова О. Н., Гулюкин А. М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; 4: 4–6. eLIBRARY ID: 26534058.
- Ботвинкин А. Д., Зарва И. Д., Яковчич Н. В., Адельшин Р. В., Мельникова О. В., Андаев Е. И. и др. Эпидемиологический анализ вспышек бешенства в Забайкалье после трансграничного заноса инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019; 9 (3): 15–24. DOI: 10.18565/epidem.2019.9.3.15-24.
- Зарва И. Д., Ботвинкин А. Д., Горяев Д. В., Демчин П. М., Дмитриева Г. М., Зайкова Т. А. и др. Анализ распространенности бешенства в островных лесостепях Восточной Сибири на основе ГИС-технологий. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019; 4 (2): 48–57. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-48-57.
- Сидоров Г. Н., Полещук Е. М., Сидорова Д. Г. Природные очаги бешенства в России в XX – начале XXI веков. *Ветеринарная патология*. 2004; 3 (10): 86–101. eLIBRARY ID: 9165689.
- Сидорова Д. Г., Сидоров Г. Н., Полещук Е. М., Колычев Н. М. Бешенство в Восточной Сибири в XX – начале XXI веков. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2007; 35 (55): 168–172. eLIBRARY ID: 12292732.

- Васенин А. А., Флоренсова В. А. Профилактика природно-очаговых инфекций. *Природно-очаговые инфекции Восточной Сибири: сб. научных трудов*. Кызыл, 1970; 9: 150–154.
- Опарин П. С., Куруц Г. А., Шептунов С. И. Местные случаи малярии и бешенства в Иркутске. *Сибирь–Восток*. 1998; 2: 3–5.
- Рященко С. В., Смирнова В. И. Вопросы географии бешенства в Предбайкалье. *Вопросы географии Сибири и Дальнего Востока: материалы IV Научной конференции молодых географов*. Отв. ред. И. А. Хлебович. 1969: 180–182.
- Флоренсова В. А. Бешенство. *Природно-очаговые инфекции Восточной Сибири: сб. научных трудов*. Кызыл, 1970; 9: 146–149.
- Животные без владельцев. *Служба ветеринарии Иркутской области*. Режим доступа: <https://irkobl.ru/sites/vet/brodiagi/> (дата обращения: 14.01.2020).
- Ботвинкин А. Д., Кузьмин И. В., Борисова Т. И., Бахум С. В., Балагурова Г. Г., Бояркин И. В. Лиссавирус обнаружен у летучей мыши в Иркутске на фоне длительного благополучия территории по заболеваемости бешенством. *Актуальные проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения: материалы IV Межрегиональной научно-практической конференции*. Омск; 2003; 1: 404–406. eLIBRARY ID: 25848135.
- Полещук Е. М., Сидоров Г. Н., Сарыглар Л. К. и др. Профилактика бешенства в условиях отгонно-пастбищного животноводства (на примере Республики Тыва): методические рекомендации. Омск: Полиграфический центр КАН; 2016. 99 с.
- Щепин С. Г., Андриевская Ю. Г., Козулина Н. Н., Демина Е. А., Сутила В. И., Переплеткин Д. О. и др. Оценка численности и особенностей распределения лисицы (*Vulpes vulpes*) и волка (*Canis lupus*) до и после выявления эпизоотий бешенства в Республике Бурятия. *Байкальский зоологический журнал*. 2019; 3 (26): 119–127. eLIBRARY ID: 42389071.
- Обзор состояния популяций основных видов пушных зверей на территории Российской Федерации (по состоянию с 2005 по 2015 г.). М.: НО «Российский пушно-меховой союз»; Буки Веди; 2016. 104 с.
- Преловский В. А., Пономарев Г. В., Камбалин В. С. Современное состояние охотничье-промысловых ресурсов Сибири. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Науки о Земле*. 2018; 24: 81–98. DOI: 10.26516/2073-3402.2018.24.81.
- Ботвинкин А. Д., Зарва И. Д., Баландина Т. П., Шарова М. А., Шоболева Р. С., Гришин А. В. и др. Постэкспозиционная профилактика бешенства на территориях с различной эпизоотической обстановкой. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 3 (20): 139–144. eLIBRARY ID: 29426082.
- Савиных Д. Ф., Углов А. Г., Гордеев П. П., Балагурова Г. Г., Баландина Т. П., Нурсаянова Л. П., Ботвинкин А. Д. Антирабическая помощь населению Иркутской области. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2004; 3 (1): 149–152.

REFERENCES

- Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Attlan M., et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9 (4): e0003709. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003709.
- Metlin A. E. Complex of measures and methods for rabies diagnosis and control [Kompleks sredstv i metodov diagnostiki i bor'by s beshenstvom]: thesis abstract ... Doctor of Science (Veterinary Medicine). Kazan; 2018. 47 p. (in Russian)
- Franka R., Wallace R. Rabies diagnosis and surveillance in animals in the era of rabies elimination. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2018; 37 (2): 359–370. DOI: 10.20506/rst.37.2.2807.
- Rupprecht C. E., Abela-Ridder B., Abila R., Amparo A. C., Banyard A., Blanton J., et al. Towards rabies elimination in the Asia-Pacific region: From theory to practice. *Biologicals*. 2020; 64: 83–95. DOI: 10.1016/j.biologics.2020.01.008.
- Poleschuk E. M., Sidorov G. N., Nashatyreva D. N., Gradoboyeva E. A., Paksina N. D., Popova I. V. Rabies in the Russian Federation [Beshenstvo v Rossijskoj Federacii]. *Information and analysis newsletter*. Омск: Izdatelsky Tsentr KAN; 2019. 110 p. eLIBRARY ID: 41024936. (in Russian)
- Shabeikin A. A., Zaikova O. N., Gulyukin A. M. Overview on epizootic situation on rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinaria Kubani*. 2016; 4: 4–6. eLIBRARY ID: 26534058. (in Russian)
- Shulpin M. I., Nazarov N. A., Chupin S. A., Korennoy F. I., Metlin A. E., Mischenko A. V. Rabies surveillance in the Russian Federation. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 2018; 37 (2): 483–495. DOI: 10.20506/rst.37.2.2817.
- Botvinkin A. D., Zharva I. D., Yakovchits N. V., Adelsin R. V., Melnikova O. V., Andae E. I., et al. Epidemiological analysis of rabies outbreaks in the Trans-Baikal Region after transboundary drift of infection. *Epidemiology and Infectious Diseases*. [Épidemiologià i infekcionnye bolezni]. 2019; 9 (3): 15–24. DOI: 10.18565/epidem.2019.9.3.15-24. (in Russian)
- Zharva I. D., Botvinkin A. D., Goryaev D. V., Demchin P. M., Dmitrieva G. M., Zaykova T. A., et al. Geographic information system analysis of rabies spread in island forest-steppe of East Siberia. *Fundamental and Cli-*

nical Medicine. 2019; 4 (2): 48–57. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-48-57. (in Russian)

10. Sidorov G. N., Poleschuk E. M., Sidorova D. G. Natural rabies outbreaks in Russia in XX – early XXI centuries [Prirodnye ochagi beshenstva v Rossii v XX – nachale XXI vekov]. *Veterinarnaya patologiya*. 2004; 3 (10): 86–101. eLIBRARY ID: 9165689. (in Russian)

11. Sidorova D. G., Sidorov G. N., Poleschuk E. M., Kolychev N. M. Rabies in East Siberia in XX – beginning XXI. *Acta Biomedica Scientifica*. 2007; 35 (55): 168–172. eLIBRARY ID: 12292732. (in Russian)

12. Vasenin A. A., Florensova V. A. Prevention of natural focal infections [Profilaktika prirodno-ochagovykh infekcij]. In: *Natural focal infections in Eastern Siberia: proceedings [Prirodno-ochagovye infekcii Vostochnoj Sibiri]*. Kyzyl, 1970; 9: 150–154. (in Russian)

13. Oparin P. S., Kuruts P. S., Sheptunov S. I. Local malaria and rabies cases in Irkutsk [Mestnye sluchai malyarii i beshenstva v Irkutске]. *Sibir – Vostok*. 1998; 2: 3–5. (in Russian)

14. Rjaschenko S. V., Smirnova V. I. Geographical issues of rabies in Cisbaikalia [Voprosy geografii beshenstva v Predbaikal'e]. In: *Geographical issues of Siberia and Far East [Voprosy geografii Sibiri i Dal'nego Vostoka]: proceedings of the IV Scientific Conference of Young Geographers*. Ex. editor I. A. Khlebovich. 1969: 180–182. (in Russian)

15. Florensova V. A. Rabies [Beshenstvo]. In: *Natural focal infections in Eastern Siberia: proceedings [Prirodno-ochagovye infekcii Vostochnoj Sibiri]*. Kyzyl, 1970; 9: 146–149. (in Russian)

16. Animals without owners [Zhivotnye bez vladel'cev]. *Irkutsk Oblast Veterinary Service*. Available at: <https://irkobl.ru/sites/vet/brodiagi/> (date of access: 14.01.2020). (in Russian)

17. Botvinkin A. D., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Bakhum S. V., Balagurova G. G., Boyarkin I. V. Lyssavirus detected in bat in Irkutsk against the background of long rabies-freedom in the region [Lissavirus obnaruzhen u letuchej myshi v Irkutске na fone dlitel'nogo blagopoluchiya territorii po zabolevaemosti beshenstvom]. *Topical issues of public sanitary and epidemiological well-being [Aktual'nye problemy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya]: proceedings of the IV interregional research to practice conference*. Omsk; 2003; 1: 404–406. eLIBRARY ID: 25848135. (in Russian)

18. Poleschuk E. M., Sidorov G. N., Saryglar L. K., et al. Rabies prevention in the context of transhumance grazing (case study: Republic of Tyva) [Pro-

filaktika beshenstva v usloviyah otgonno-pastbishchnogo zhivotnovodstva (na primere Respubliki Tyva): methodical guidelines. Omsk: Poligrafichesky Tsentr KAN; 2016. 99 p. (in Russian)

19. Schepin S. G., Andrievskaya Yu. G., Kozulina N. N., Demina E. A., Sutula V. I., Perepletkin D. O., et al. Assessment of abundance and peculiarities of fox (*Vulpes vulpes*) and wolf (*Canis lupus*) distribution before and after of rabies outbreaks in the Republic of Buryatia. *Baikal Zoological Journal*. 2019; 3 (26): 119–127. eLIBRARY ID: 42389071. (in Russian)

20. Review of the status of population of the significant fur animals in the Russian Federation (as of 2005–2015) [Obzor sostoyaniya populatsii osnovnykh vidov pushnykh zverey na territorii Rossijskoj Federacii (po sostoyaniyu s 2005 po 2015 g.)]. M.: NO HO "Russian Fur Union"; Buki Vedi; 2016. 104 p. (in Russian)

21. Prelovskiy V. A., Ponomarev G. V., Kambalin V. S. The modern state of hunting resources of Siberia. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series: Earth Sciences*. 2018; 24: 81–98. DOI: 10.26516/2073-3402.2018.24.81. (in Russian)

22. Freuling C. M., Hampson K., Selhorst T., Schröder R., Meslin F. X., Mettenleiter T. C., Müller T. The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Philos. Trans. R. Soc. B*. 2013; 368 (1623):20120142. DOI: 10.1098/rstb.2012.0142.

23. Steck F., Wandeler A., Bichsel P., Capt S., Schneider L. Oral immunisation of foxes against rabies: A field study. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1982; 29 (5): 372–396. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1982.tb01237.x.

24. Botvinkin A. D., Zarva I. D., Balandina T. P., Sharova M. A., Shoboeva R. S., Grishin A. V., et al. Rabies postexposure prophylaxis in the regions differed by rabies registration in animals. *Infectious diseases: news, views, education*. 2017; 3 (20): 139–144. eLIBRARY ID: 29426082. (in Russian)

25. Savinikh D. F., Ugllov A. G., Gordeyev P. P., Balagurova G. G., Balandina T. P., Nursayanova L. P., Botvinkin A. D. Anti-rabies assistance to the Irkutsk Oblast community [Antirabicheskaya pomoshch' naseleniyu Irkutskoj oblasti]. *Acta Biomedica Scientifica*. 2004; 3 (1): 149–152. (in Russian)

Поступила 20.07.2020

Принята в печать 05.08.2020

Received on 20.07.2020

Approved for publication on 05.08.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мельцов Иван Владимирович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры специальных ветеринарных дисциплин ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ, г. Иркутск, Россия.

Аблов Александр Михайлович, заместитель директора ФГБУ «Иркутская МВЛ», г. Иркутск, Россия.

Школьников Екатерина Николаевна, ветеринарный врач ФГБУ «Иркутская МВЛ», г. Иркутск, Россия.

Коплик Марина Емельяновна, ветеринарный врач ФГБУ «Иркутская МВЛ», г. Иркутск, Россия.

Минченко Павел Александрович, заместитель начальника отдела охраны и регулирования использования объектов животного мира и среды их обитания Министерства лесного комплекса Иркутской области, г. Иркутск, Россия.

Десятова Татьяна Викторовна, сотрудник отдела науки ФГБУ «Заповедное Прибайкалье», г. Иркутск, Россия.

Зарва Иван Дмитриевич, ассистент кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, г. Иркутск, Россия.

Ботвинкин Александр Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, г. Иркутск, Россия.

Метлин Артем Евгеньевич, доктор ветеринарных наук, первый заместитель директора ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Ivan V. Meltsov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Chair of Special Veterinary Disciplines, FSBEI HE Irkutsk SAU, Irkutsk, Russia.

Alexander M. Ablov, Deputy Director, Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory, Irkutsk, Russia.

Ekaterina N. Shkolnikova, Veterinarian, Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory, Irkutsk, Russia.

Marina E. Koplik, Veterinarian, Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory, Irkutsk, Russia.

Pavel A. Minchenko, Deputy Head, Department for the Protection and Regulation of the Use of Wildlife Objects and their Environment, Ministry of the Forestry Complex of Irkutsk Region, Irkutsk, Russia.

Tatyana V. Desyatova, Researcher, Scientific Department, FGBl "Rezerved Cisbaikalia", Irkutsk, Russia.

Ivan D. Zarva, Post-Graduate Student, Department of Epidemiology, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia.

Alexander D. Botvinkin, Doctor of Science (Medicine), Professor, Head of Department of Epidemiology, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia.

Artem Ye. Metlin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), First Deputy Director, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-162-169

УДК 619:616.98:578.824.11:616-036.22(470)

Оценка эффективности противоэпизоотических мероприятий против бешенства, осуществляемых в Российской Федерации

С. В. Щербинин¹, Т. В. Вадопалас², Ф. И. Коренной³, К. А. Блохина⁴, А. К. Караулов⁵

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

¹ ORCID 0000-0002-6434-0683, e-mail: sherbinin@arriah.ru² ORCID 0000-0002-6681-9364, e-mail: vadopalas@arriah.ru³ ORCID 0000-0002-7378-3531, e-mail: korennoy@arriah.ru⁴ ORCID 0000-0001-6498-5257, e-mail: blohina@arriah.ru⁵ ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Бешенство – зооантропонозное заболевание, наносящее значительный экономический ущерб, складывающийся из потерь в результате падежа животных, затрат на проведение профилактических мероприятий и диагностических исследований. Болезнь передается при укусе или ослюнении поврежденных поверхностей кожи, слизистых оболочек. Заболевание характеризуется абсолютной летальностью, ему подвержены практически все теплокровные животные. В работе проведен анализ статистических данных по заболеваемости и смертности людей и животных от бешенства, проведена оценка эпизоотической ситуации в Российской Федерации, включающая охват вакцинацией целевых популяций, а также оценка эффективности мер, применяемых в России для предотвращения распространения бешенства. Рассмотрены основные причины смертности людей. Даны рекомендации по снижению риска распространения заболевания. Было выявлено, что за последние 10 лет (с 2010 по 2019 г.) на территории Российской Федерации зарегистрировано 60 случаев гибели людей от бешенства и около 45 тысяч случаев падежа животных. Кроме этого, ежегодно фиксируются случаи ослюнений/оцарапываний/покусов людей (397 248 случаев за 2019 г., из них 10 232 – дикими животными). Источниками заражения людей за указанный период являлись: собака (39%), лисица (18%), кошка (14%), енотовидная собака (14%), волк (4%), песец (4%), хорек (4%), неизвестный источник (3%). В результате анализа данных ветеринарных форм отчетности выявили, что самыми неблагополучными по бешенству являются Центральный и Приволжский федеральные округа. В представленной работе с помощью математического моделирования эпизоотического процесса оценены результаты профилактической работы, проводимой ветеринарной службой при возникновении бешенства в регионе.

Ключевые слова: бешенство, анализ, эпизоотическая ситуация, вакцинация, регионализация, противоэпизоотические мероприятия.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках научно-исследовательских работ по теме «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Щербинин С. В., Вадопалас Т. В., Коренной Ф. И., Блохина К. А., Караулов А. К. Оценка эффективности противоэпизоотических мероприятий против бешенства, осуществляемых в Российской Федерации. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 162–169. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-162-169.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Щербинин Сергей Владимирович, ведущий ветеринарный врач ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: sherbinin@arriah.ru.

UDC 619:616.98:578.824.11:616-036.22(470)

Evaluation of rabies control measure effectiveness in the Russian Federation

S. V. Shcherbinin¹, T. V. Vadopalas², F. I. Korennoy³, K. A. Blokhina⁴, A. K. Karaulov⁵

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

¹ ORCID 0000-0002-6434-0683, e-mail: sherbinin@arriah.ru² ORCID 0000-0002-6681-9364, e-mail: vadopalas@arriah.ru³ ORCID 0000-0002-7378-3531, e-mail: korennoy@arriah.ru⁴ ORCID 0000-0001-6498-5257, e-mail: blohina@arriah.ru⁵ ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

SUMMARY

Rabies is a zoonothonotic disease, causing significant economic damage, resulting from losses due to livestock deaths, costs of preventive measures and diagnostic tests. The disease is transmitted through biting or licking of damaged skin or mucosa. The disease is absolutely fatal and practically all warm-blooded animals are

susceptible to it. The paper presents the analysis of statistical data on rabies morbidity and mortality among humans and animals; the assessment of epidemic situation in the Russian Federation, including the target population vaccination coverage and effectiveness evaluation of measures, taken in Russia to prevent rabies spread. The major causes of human mortality are considered. The recommendations on decreasing the disease spread risks are given. It was established that about 60 thousand human deaths and 45 thousand animal deaths from rabies have been reported in the Russian Federation within the past 10 years (from 2010 to 2019). Moreover cases of licking/scratching/biting of humans (397,248 cases in 2019, out of them 10,232 by wild animals) are reported every year. The sources of human infection within the mentioned period were dogs (39%), foxes (18%), cats (14%), raccoon dogs (14%), wolves (4%), polar foxes (4%), ferrets (4%), unknown sources (3%). The analysis of data from veterinary reports showed that the most rabies-infected regions are the Central and Volga Federal Districts. Using the mathematical modeling of the epidemic process the results of preventive measures, taken by the Veterinary Service in case of rabies in the region, were evaluated.

Key words: rabies, analysis, epidemic situation, vaccination, regionalization, anti-epidemic measures.

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Shcherbinin S. V., Vadopalas T. V., Korennoy F. I., Blokhina K. A., Karaulov A. K. Evaluation of rabies control measure effectiveness in the Russian Federation. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 162–169. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-162-169.

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

For correspondence: Sergey V. Shcherbinin, Leading Veterinarian, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: shcherbinin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство, или гидрофобия, является одним из зооантропонозных заболеваний, которое, за исключением Антарктики, присутствует во всем мире. Это смертельная болезнь представляет собой серьезную угрозу для общественного здоровья. Несмотря на то что случаи заболевания среди людей можно предотвратить посредством своевременных постконтактных профилактических мер, контроль и ликвидация возможны только в популяциях резервуаров, например, среди лис и домашних собак [1].

С учетом характера резервуара возбудителя бешенства различают эпизоотии природного типа (болезнь распространяют дикие плотоядные животные) и городского типа (источниками вируса и распространителями болезни являются бродячие собаки и кошки, численность которых определяет масштабы эпизоотии) [2].

По оценкам исследователей, каждый год в мире от бешенства умирают около 60 тыс. человек и около 29 млн обращаются за антирабической помощью после контакта с подозреваемым на заболевание животным [3].

Ежегодно для предотвращения распространения бешенства среди животных и снижения вероятности заражения людей затрачиваются огромные финансовые средства. На территории Российской Федерации осуществляется вакцинация домашних и диких восприимчивых животных, постконтактная профилактика людей, контроль над перемещениями плотоядных животных (требования регионализации).

Целью данной работы явился анализ статистических данных по заболеваемости бешенством и смертности от него людей и животных в Российской Федерации за период с 2010 по 2019 г., а также оценка эффективности проводимых мер и выработка рекомендаций по снижению риска распространения заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали статистические данные по заболеваемости и смертности животных и людей, вызванными вирусом бешенства (табл. 1), количество

перемещений домашних плотоядных животных, количество выявленных нарушений при перемещениях (данные ИС «Меркурий»). Провели анализ влияния профилактических мероприятий на заболеваемость людей, используя популяционные показатели эпизоотического процесса. Оценивали влияние вакцинации домашних и диких животных на риск заражения населения бешенством с помощью моделирования.

Для оценки напряженности эпизоотической ситуации в федеральных округах Российской Федерации использовали индекс эпизоотичности, который рассчитывается по формуле:

$$Иэ = t/T,$$

где Иэ – индекс эпизоотичности; t – число дней (месяцев, лет), в течение которых регистрировали данную болезнь; T – число дней (месяцев, лет) наблюдения.

На основании величины индекса эпизоотичности проведено ранжирование федеральных округов по уровню неблагополучия.

Для количественной оценки влияния проводимой вакцинации на риск инфицирования населения было проведено моделирование возможного числа людей, инфицированных бешенством в результате укусов дикими и домашними животными. Моделирование производилось с использованием вероятностного подхода в соответствии с двумя сценариями: 1) профилактическая вакцинация животных против бешенства отсутствует; 2) вакцинация применяется. Вероятное количество инфицированных людей моделировалось с помощью гипергеометрического распределения, оценивающего вероятность инфицирования s человек при наличии исходных данных о размере популяции животных (M), количества инфицированных животных в ней (D) и количества зарегистрированных покусов (n) (табл. 1).

Учитывались следующие исходные параметры: средняя иммуногенная активность вакцины – 87% [5]; средняя поедаемость приманок с вакциной дикими животными – 50% [6]. Применялись следующие допущения: 1) вероятность инфицирования человека при

Таблица 1
Статистические данные для проведения моделирования

Table 1
Statistical data for modeling

Показатель (за 2019 г.)	Значение	Источник
Число зараженных диких животных	587 голов	МСХ РФ, годовой отчет ИАЦ
Число зараженных домашних животных	586 голов	МСХ РФ, годовой отчет ИАЦ
Число контактов диких животных с людьми	10 232	Роспотребнадзор
Число контактов домашних плотоядных животных с людьми	387 016	Роспотребнадзор
Численность диких плотоядных животных	753 200 голов	Минприроды, Центрохотконтроль РФ
Из них лисиц	496 300 голов	Минприроды, Центрохотконтроль РФ
Численность домашних плотоядных животных	52 600 000 голов	Оценочное значение [4]
Разложено приманок с вакцинами	20 684 436 доз	МСХ РФ
Вакцинировано домашних плотоядных животных	8 548 904 голов	МСХ РФ

укусе большим животным – 100%; 2) приманки поедались только лисами [7].

Для изучения взаимосвязи объема вакцинации с уровнем заболеваемости по федеральным округам за 2010–2019 гг. был проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Российская Федерация является эндемичной территорией по бешенству. За 2010–2019 гг. в РФ зарегистрировано 60 случаев гибели людей от этого заболевания и около 45 219 случаев падежа животных (данные МСХ РФ и Роспотребнадзора).

Из 86 субъектов Российской Федерации стационарно благополучными по бешенству животных за период с 2010 по 2018 гг. были: Республика Карелия, Камчатский край, Архангельская, Мурманская, Иркутская, Магаданская, Сахалинская области, г. Санкт-Петербург. В 2019 г., помимо перечисленных выше регионов, благополучие наблюдалось в Республике Коми, Чеченской Республике, Кемеровской области и Приморском крае.

Неблагополучие по федеральным округам ранжировано на основе индекса эпизоотичности (табл. 2).

За период наблюдения в 53,6% случаев люди заражались после контактов с домашними плотоядными (собаками и кошками). При этом на долю собак приходилось 39%, кошек – 14% заражений. Среди диких источников заражения бешенством – лисица (18%), енотовидная собака (14%), волк (4%), песец (4%), хорек (4%), неизвестный источник (3%) [9] (рис. 1).

Основными причинами смертности людей являются: неправильно поставленный диагноз, запоздалая постконтактная профилактика, отказ от вакцинации домашних плотоядных [9].

Вакцинация

В Российской Федерации в 2019 г. вакцинировано против бешенства 19 842 548 домашних (включая сель-

скохозяйственных) восприимчивых животных. Кроме того, было разложено 20 684 436 доз оральной вакцины для диких животных. При фактической численности популяции кошек и собак в 52,6 млн голов вакцинировано 8 548 904 животных, то есть 16,25%, чего явно не достаточно для формирования эффективного популяционного иммунитета (эффективная вакцинация достигается при иммунизации до 90% домашних животных (собак) и не менее 70% особей в популяциях диких плотоядных [10, 11]).

Ниже представлены графики корреляции заболеваемости с фактическим охватом вакцинацией против бешенства домашних и диких плотоядных, а также сельскохозяйственных животных за последние 10 лет по федеральным округам (рис. 2–4).

Корреляция объема вакцинации с заболеваемостью составила: для домашних плотоядных $r = 0,96$; для диких плотоядных $r = 0,86$; для сельскохозяйственных животных $r = 0,95$. При этом не обнаружено корреляции между объемом исследований на бешенство и заболеваемостью животных. В результате анализа корреляционных связей возможен вывод о неэффективности увеличения охвата животных вакцинацией при сохранении текущего подхода к профилактике, то есть без учета популяций риска. Однако эта мнимая неэффективность программы вакцинации за счет увеличения охвата иммунизацией городской популяции восприимчивых животных связана с практикой вакцинации только зарегистрированных домашних плотоядных (служебные животные, выставочные животные, животные в приютах и т. д.) на фоне высокой заболеваемости безнадзорных и, соответственно, невакцинированных животных. Эффективность профилактики «городского бешенства» напрямую зависит от охвата вакцинацией целевых популяций [11]. Рекомендуется разработать меры по учету и контролю городских животных (чипизация, паспортизация, регуляция численности) и увеличить охват вакцинацией до 90% популяции [10].

Таблица 2
Ранжирование федеральных округов РФ по уровню неблагополучия по бешенству

Table 2
Ranking of RF Federal Districts based on rabies infection level

Федеральный округ	Средний индекс эпизоотичности (2010–2019 гг.)	Ранг [8] (уровень риска*)
Центральный (ЦФО)	0,99	0,9–1,0 (катастрофический)
Приволжский (ПФО)	0,978	
Северо-Кавказский (СКФО)	0,88	> 0,9–0,5 (высокий)
Южный (ЮФО)	0,86	
Уральский (УФО)	0,85	
Сибирский (СФО)	0,77	
Дальневосточный (ДФО)	0,35	> 0,5–0,1 (умеренный)
Северо-Западный (СЗФО)	0,32	
г. Байконур	0,0	> 0,1 (низкий)

*Уровни риска:

катастрофический – заболевание выявлено во всех регионах и за все время наблюдения (практически 100%-я вероятность распространения в другие федеральные округа);

высокий – заболевание наблюдается в большинстве регионов, улучшение ситуации за исследуемый период минимальное (высокая вероятность распространения в другие федеральные округа);

умеренный – меньше половины регионов затронуты заболеванием (в течение срока наблюдения прослеживается тенденция к улучшению эпизоотической ситуации; вероятность распространения в другие регионы мала);

низкий – благополучие территории или спорадические случаи бешенства (очень низкая вероятность распространения в другие регионы ввиду наличия естественных и искусственных географических барьеров).

*Risk levels:

catastrophic – the disease was reported in all regions throughout the observation time (practically 100% likelihood of the disease spread to the other Federal Districts);

high – the disease is reported in most regions, the improvement of the situation within the studied period is minimal (high likelihood of the disease spread to the other Federal Districts);

moderate – less than half of the regions are infected (within the observation period the tendency towards improvement was noted; the likelihood of the disease spread to the other Federal Districts is low);

low – the territory is free or sporadic rabies cases are reported (very low likelihood of the disease spread to other regions due to natural or artificial geographical barriers).

Что касается диких животных, то мнимая неэффективность программы вакцинации за счет увеличения объема распространения приманок, вероятно, связана с ориентацией на популяцию лис при неизвестной численности остальных видов диких плотоядных животных, в то время как последние активно включаются в эпизоотический процесс. Рекомендуется разработать методы оральной вакцинации для большинства видов диких плотоядных, чтобы их иммунизация охватывала как минимум 70% популяции [10].

Сельскохозяйственные животные являются тупиком в эпизоотической цепи бешенства. Вакцинация данных животных зачастую проводится во исполнение требований к проведению противоэпизоотических мероприятий в очаге бешенства, при этом не во всех животноводческих объектах выполняются нормативы по биобезопасности, что создает угрозу заражения сельскохозяйственных животных от диких или бродячих домашних плотоядных. Поэтому при планировании иммунизации сельскохозяйственных животных рекомендуется использовать риск-ориентированный подход и обратить особое внимание на программу вакцинации в популяциях с высоким риском с учетом



Рис. 1. Источники заражения людей бешенством [9]

Fig. 1. Human infection sources [9]



Рис. 2. Корреляция заболеваемости с фактическим охватом вакцинацией против бешенства у домашних плотоядных за 2010–2019 гг.

Fig. 2. Correlation between morbidity and vaccination coverage against rabies in domestic carnivores (2010–2019)

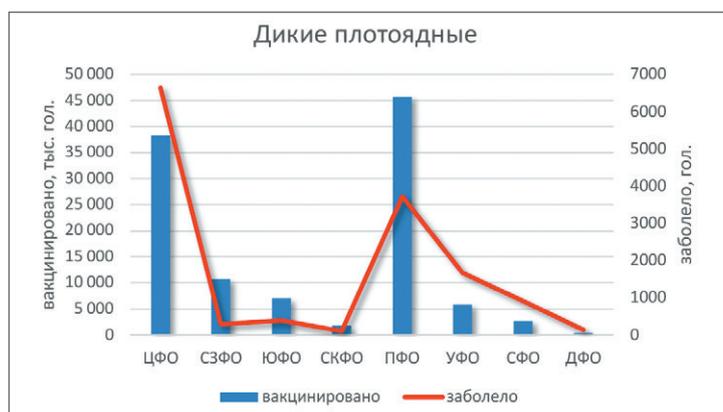


Рис. 3. Корреляция заболеваемости с количеством разложенных приманок против бешенства у диких плотоядных за 2010–2019 гг.

Fig. 3. Correlation between morbidity and amount of distributed baits against rabies in carnivores (2010–2019)

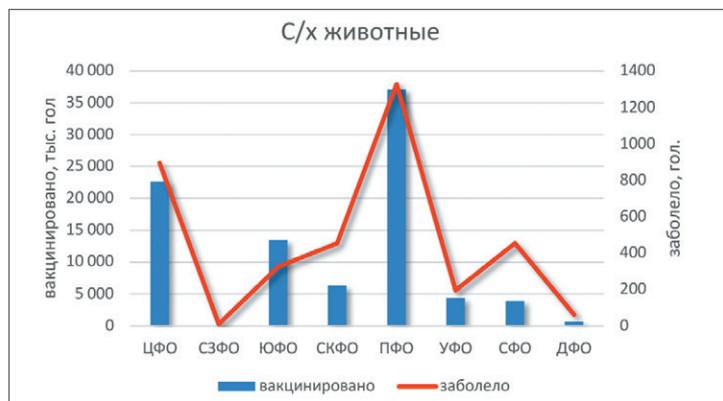


Рис. 4. Корреляция заболеваемости с фактическим охватом вакцинацией против бешенства у сельскохозяйственных животных за 2010–2019 гг.

Fig. 4. Correlation between morbidity and vaccination coverage against rabies in livestock (2010–2019)

требований биобезопасности и в рамках выполнения комплекса мер по снижению распространения бешенства (90%-й охват вакцинацией городской популяции и 70%-й – иммунных диких плотоядных [10, 11]).

Постконтактная профилактика

Фактором, увеличивающим смертность, является недостаточная информированность людей о потенциальной угрозе при покусах/ослужении/оцарапывании не только диких, но и домашних животных и пониженная ответственность по соблюдению предписанной терапии.

При обращении пострадавшего в медицинское учреждение рану обрабатывают и, в зависимости от ее характера, обкалывают антирабическим иммуноглобулином, а затем проводят профилактику развития заболевания антирабической вакциной КОКАВ (Россия) на 0, 3, 7, 14, 30 и 90-й день. В большинстве случаев данная терапия эффективна, но если ранение произошло в непосредственной близости к головному мозгу или площадь ранения обширна, то высокая инфицирующая доза вируса бешенства сводит на нет все попытки предотвратить клинические проявления гидрофобии.

В 2010–2019 гг. на территории РФ погибло от бешенства 60 человек: из-за необращения за медицинской помощью – 67,8%; из-за самовольного нарушения схемы вакцинации – 17,9%; по вине медработников – 1 человек (3,6%); на фоне правильно проводимого лечения из-за укусов опасной локализации и короткого инкубационного периода – 2 человека (7,1%); при неизвестных обстоятельствах – 1 человек (3,6%). За последние 20 лет от бешенства умерло 195 человек [9].

В 2019 г. выявлено 397 248 случаев ослужений/оцарапываний/покусов людей животными, из них 10 232 – дикими, при этом от гидрофобии погибли 2 человека [9].

Ввиду того что неплотоядные животные и человек являются тупиковыми хозяевами инфекции, при оценке риска нами использовались значения превалентности у диких и домашних плотоядных.

Результаты моделирования (рис. 5, 6) показывают, что при отсутствии вакцинации животных наиболее вероятное количество инфицированных людей могло бы составить: при покусах дикими животными – 7–8 человек, при покусах домашними животными – 4 человека. При фактической вакцинации популяций домашних и диких животных число возможных заражений уменьшается: при покусах дикими животными – до 5 человек, при покусах домашними животными – до 3 человек. При этом количество зараженных животных снижается в дикой популяции с 587 до 409 особей, в домашней – с 586 до 504 особей.

Гипотетическое повышение иммуногенной активности вакцины до 100% не оказывает существенного эффекта: ожидаемое число инфицированных людей не изменяется.

В некоторых исследованиях авторами описывается поедаемость приманок с оральной вакциной в 40–60% [6], в то время как в других исследованиях она гораздо выше: от 80 до 90% [12]. В данном исследовании мы выбрали среднее значение более низкого показателя поедаемости для моделирования процесса в режиме высокого риска распространения. Это связано с тем, что нами не учитывались другие виды диких плотоядных животных, которых, в отличие от лис, не подвергают иммунизации, но при этом они участвуют

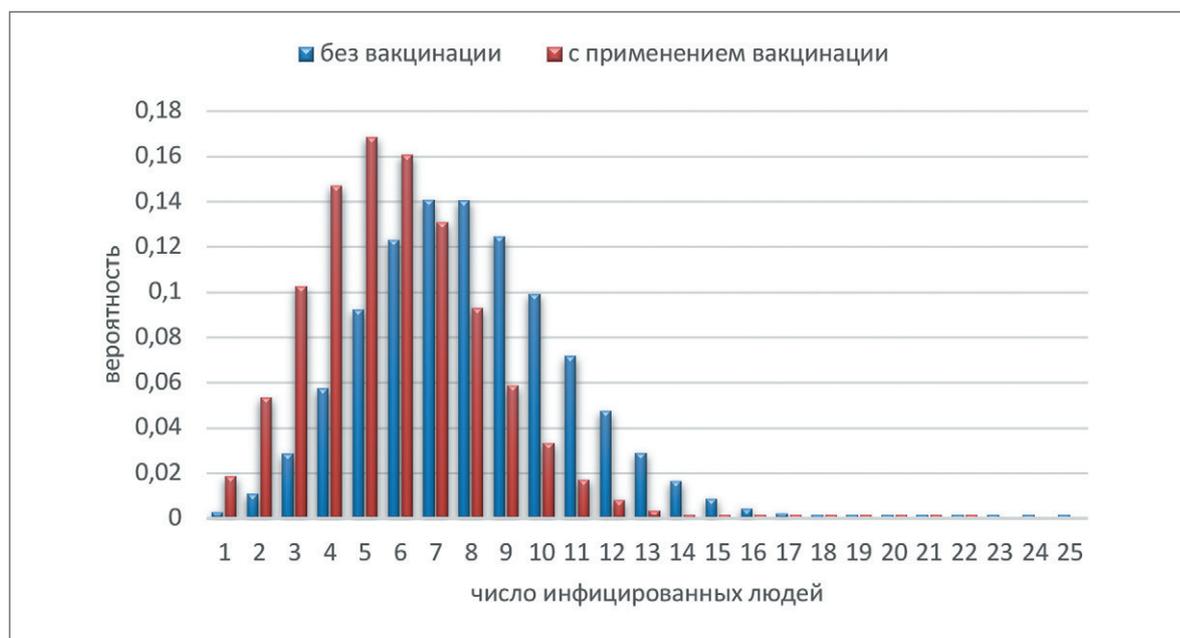


Рис. 5. Распределение ожидаемого количества инфицированных людей при укусах дикими животными (с вакцинацией и без вакцинации)

Fig. 5. Distribution of the expected number of infected humans when bitten by wild animals (vaccinated and non-vaccinated)

в эпизоотическом процессе (куницы, барсуки, корсаки и др.). Соответственно, присутствует определенная доля смещения данных и результатов моделирования, ввиду чего возникает необходимость в увеличении выходных данных.

Повышение поедаемости приманок дикими животными могло бы иметь бóльший эффект. Так, при увеличении поедаемости приманок лисами до 100%

ожидаемое число инфицированных людей при укусах дикими животными могло бы снизиться до 3 человек.

Проблема вакцинации состоит в невозможности тотального отлова и проведения профилактических мероприятий в популяциях безнадзорных животных. Необходима также иммунизация домашних плотоядных, которые могут выходить на улицу, а также животных, проживающих в частных домах.

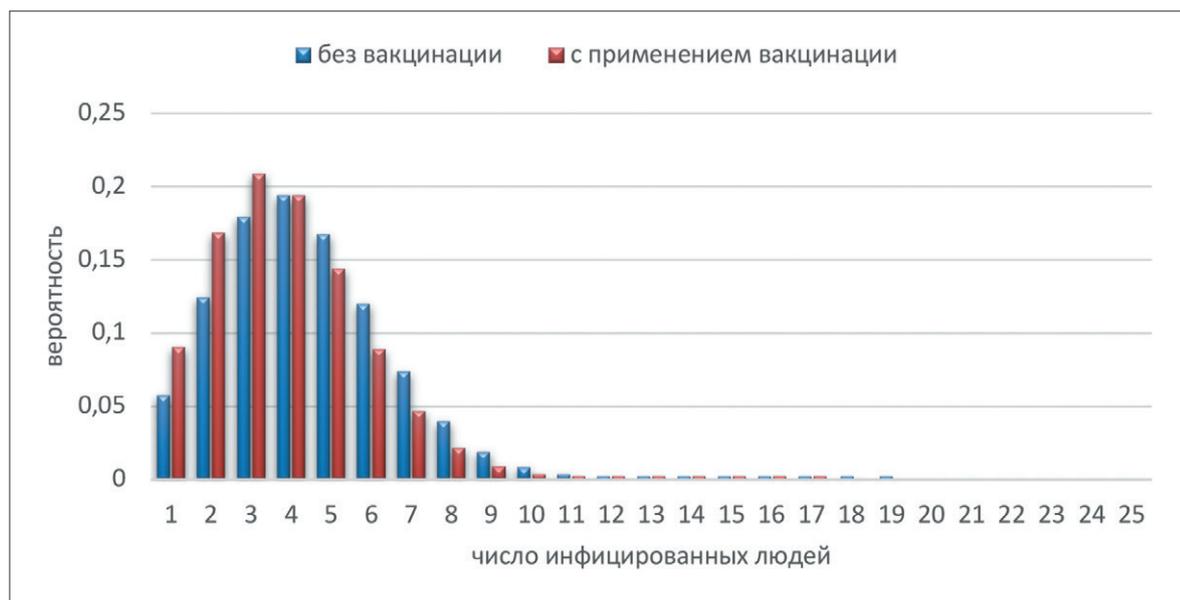


Рис. 6. Распределение ожидаемого количества инфицированных людей при укусах домашними животными (с вакцинацией и без вакцинации)

Fig. 6. Distribution of the expected number of infected humans when bitten by domestic animals (vaccinated and non-vaccinated)

На сегодняшний день оральная вакцинация предусмотрена только для лисиц в связи с тем, что они проявляют специфическое поведение при поедании приманок, необходимое для эффективной вакцинации [7]. Однако при этом другие восприимчивые животные остаются интактными и активно включаются в эпизоотический процесс.

Среднегодовые уровни смертности людей от бешенства свидетельствуют о недостаточности информационно-образовательных мероприятий, которые должны приводить к осознанию необходимости принятия профилактических мер.

Надзор за перемещением животных

За период с 2010 г. отмечается 10 завозных случаев бешенства людей. В основном это туристы, контактировавшие с больными животными в других странах или регионах и обратившиеся за помощью в связи с появлением симптомов заболевания после возвращения домой [9].

За 2019 г. зафиксировано 279 391 перемещение домашних плотоядных между регионами. В соответствии с п. 4.11 Санитарных правил СП 3.1.096-96, Ветеринарных правил ВП 13.3.1103-96 (утвержденных Госкомсанэпиднадзором РФ 31.05.1996 № 11 и Минсельхозпродом РФ 18.06.1996 № 23) «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. 13. Бешенство» вывоз собак за пределы области (края, республики) разрешается при наличии ветеринарного свидетельства с отметкой о вакцинации собаки против бешенства.

По данным отчетов территориальных управлений Россельхознадзора Российской Федерации за 2019 г., зафиксировано и предотвращено 8 попыток перемещения плотоядных животных с нарушениями в оформлении ветеринарно-санитарных документов.

Наличие пресечения незаконных перемещений демонстрирует отлаженность работы системы, однако следует учитывать опасность перемещений невакцинированных домашних плотоядных дачниками (на дачу и обратно), туристами (в отпуска), охотниками (в охотничьи угодья).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бешенство представляет серьезную угрозу для здоровья людей и животных. Несмотря на прилагаемые усилия, в 2019 г. от этого заболевания погибли 2 человека и около 400 тыс. получили антирабическую помощь. Такие цифры сигнализируют о недостаточных масштабах просветительской работы и необходимости разработки и реализации дополнительных мер по профилактике бешенства. Среди таких мер, в дополнение к требованиям санитарных правил об обязательности отметки о вакцинации против бешенства в ветеринарном свидетельстве при вывозе животного за пределы региона, необходимость усиления контроля перемещений невакцинированных восприимчивых животных внутри области (края, республики).

В работе установлена прямая связь между охватом вакцинацией и заболеваемостью бешенством целевых групп животных, что, на первый взгляд, свидетельствует о несостоятельности программы увеличения объемов иммунизации. Детальный анализ показал необходимость более тщательного планирования программы вакцинации, заключающейся в контроле над популяциями и вовлечении большего количества животных. Так,

была выявлена недостаточность объемов вакцинации для формирования эффективного популяционного иммунитета и купирования распространения заболевания. Установлено, что из 52,6 млн собак и кошек иммунизировано лишь 8 548 904 особи, что составляет только 16,25% от численности этих животных. Показана необходимость большего охвата вакцинацией безнадзорных животных и усовершенствования способов вакцинации диких плотоядных животных в связи с ориентацией оральной иммунизации в большей мере на популяцию лис.

Полученные данные подтверждают актуальность мер, заложенных в «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.», выполнение которого позволит достичь эпизоотического благополучия в целевых популяциях животных (с долей иммунизированных домашних животных (собак) до 90% и диких плотоядных не менее 70% особей в популяциях) [10].

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

- Макаров В. В. Современные представления о бешенстве. *Вестник охотоведения*. 2018; 15 (3): 215–227. eLIBRARY ID: 35450767.
- Сколько всего в мире домашних животных? *Аргументы и факты*. Режим доступа: https://aif.ru/society/nature/skolko_vsego_v_mire_domashnih_zhivotnyh (дата обращения: 09.07.2020).
- Чернышова Е. В., Назаров Н. А., Метлин А. Е., Рыбаков С. С., Черпуркин А. В., Сухарьков А. Ю. и др. 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.
- Фертиков В. И. Юбилейный сборник. М.: ОЛМА-ПРЕСС; 2004. 280 с.
- Макаров В. В., Петров А. К., Васильев Д. А. Основы учения об инфекции (учебное пособие). М.: РУДН; Ульяновск: УлГТУ; 2018. 136 с.
- Оганесян А. С., Баскакова Н. Е., Коренной Ф. И., Гуленкин В. М., Дудников С. А., Караулов А. К. Методические рекомендации по полуквантитативной оценке эпизоотического риска при проведении импортных операций с животными и продукцией животного происхождения: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 06.02.2015 № 14–15. Владимир; 2015. 29 с.
- Полещук Е. М., Сидоров Г. Н., Нашатырева Д. Н., Градобоева Е. А., Пакскина Н. Д., Попова И. В. Бешенство в Российской Федерации: информационно-аналитический бюллетень. Омск: Издательский центр КАН; 2019. 110 с. eLIBRARY ID: 41024936.
- Груздев К. Н., Метлин А. Е. Бешенство животных. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 394 с. eLIBRARY ID: 41355659.
- Сухарьков А. Ю., Назаров Н. А., Метлин А. Е., Рыбаков С. С., Чернышова Е. В., Еремина А. Г., Иовлева А. Ю. Анализ эффективности оральной вакцинации против бешенства животных в дикой среде на примере некоторых регионов Российской Федерации. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2010; 8: 57–63. eLIBRARY ID: 15595681.
- Сухарьков А. Ю., Чернышова Е. В., Метлин А. Е., Калишенко В. Д., Назаров Н. А., Егоров А. А. и др. Оценка поедаемости оральных антирабических вакцин. *Ветеринария*. 2011; 11: 31–34. eLIBRARY ID: 17015958.

REFERENCES

- Freuling C. M., Hampson K., Selhorst T., Schröder R., Meslin F. X., Mettenleiter T. C., Müller T. The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2013; 368 (1623): 20120142. DOI: 10.1098/rstb.2012.0142.
- Makarov V. V. Modern concepts of rabies. *The herald of game management*. 2018; 15 (3): 215–227. eLIBRARY ID: 35450767. (in Russian)
- Rabies. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies> (date of access: 09.07.2020).
- How many pets are there in the world? [Skol'ko vsego v mire domashnih zhivotnyh?]. *Argumenty i Fakty*. Available at: https://aif.ru/society/nature/skolko_vsego_v_mire_domashnih_zhivotnyh (date of access: 09.07.2020). (in Russian)
- Chernyshova Ye. V., Nazarov N. A., Metlyn A. Ye., Rybakov S. S., Cherpurkin A. V., Sukharkov A. Yu., et al. 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)

6. Fertikov V. I. Jubilee volume [Yubilejnyj sbornik]. M.: OLMA-PRESS; 2004. 280 p. (in Russian)

7. Makarov V. V., Petrov A. K., Vasilyev D. A. Basics of the doctrine of infection (manual). M.: RUDN; Ulyanovsk: UIGAU, 2018, 136 p. (in Russian)

8. Oganessian A. S., Baskakova N. E., Korennoy F. I., Gulenkin V. M., Doudnikov S. A., Karaulov A. K. Methodical recommendations on semi-quantitative assessment of epidemic risk during animal and animal product import operations [Metodicheskie rekomendacii po polukolichestvennoj ocenke epizooticheskogo riska pri provedenii importnyh operacij s zhivotnymi i produkciej zhivotnogo proiskhozhdeniya]: approved by FGBI "ARRIAH" on 06.02.2015 No. 14–15. Vladimir; 2015. 29 p. (in Russian)

9. Poleschuk E. M., Sidorov G. N., Nashatyreva D. N., Gradoboeva E. A., Paksina N. D., Popova I. V. Rabies in the Russian Federation: data analytical bulletin [Beshenstvo v Rossijskoj Federacii: informacionno-analiticheskij byulleten']. Omsk: Publishing centre KAN; 2019. 110 p. eLIBRARY ID: 41024936. (in Russian)

10. Gruzdev K. N., Metlin A. E. Animal rabies. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2019. 394 p. eLIBRARY ID: 41355659. (in Russian)

11. Sukharkov A. Yu., Nazarov N. A., Metlin A. Ye., Rybakov S. S., Chernyshova Ye. V., Yeryomina A. G., Iovleva A. Yu. Analysis of efficacy of oral rabies vaccination of wild animals by the example of some regions of the Russian Federation. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2010; 8: 57–63. eLIBRARY ID: 15595681. (in Russian)

12. Sukhar'kov A. Yu., Chernyshova E. V., Metlin A. E., Kalishenko V. D., Nazarov N. A., Egorov A. A., et al. Ways of assessing of bait uptake rate for oral rabies vaccines. *Veterinariya*. 2011; 11: 31–34. eLIBRARY ID: 17015958. (in Russian)

Поступила 20.07.2020

Принята в печать 10.08.2020

Received on 20.07.2020

Approved for publication on 10.08.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Щербинин Сергей Владимирович, ведущий ветеринарный врач ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Вадопалас Татьяна Владасовна, ведущий ветеринарный врач ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Коренной Федор Игоревич, кандидат географических наук, научный сотрудник ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Блохина Ксения Андреевна, ведущий ветеринарный врач ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Sergey V. Shcherbinin, Leading Veterinarian, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Tatiana V. Vadopalas, Leading Veterinarian, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Fedor I. Korennoy, Candidate of Science (Geography), Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ksenia A. Blokhina, Leading Veterinarian, 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.

Оптимизация параметров культивирования вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019»

В. В. Кирпиченко¹, С. В. Кононова², И. Н. Шумилова³, А. А. Нестеров⁴, М. В. Туркова⁵, Е. А. Бухон⁶,
Д. В. Роменская⁷, А. В. Спрыгин⁸, Б. Л. Манин⁹, О. П. Бьядовская¹⁰

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

¹ ORCID 0000-0002-2494-3826, e-mail: kirpichenko@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3932-2416, e-mail: kononova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-6132-5771, e-mail: shumilova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-4288-1964, e-mail: nesterov@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-6598-7593, e-mail: turkova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-2989-7793, e-mail: buhon@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-2443-1898, e-mail: romenskaya@arriah.ru

⁸ ORCID 0000-0001-5982-3675, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁹ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin@arriah.ru

¹⁰ ORCID 0000-0002-8326-7151, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в изучении респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота есть множество спорных вопросов. В связи с этим актуальным является изучение биологических свойств вируса, оптимизация методов его культивирования и подбор наиболее технологичных приемов конструирования средств диагностики и профилактики данного заболевания. Целью настоящей работы являлись выбор чувствительных клеточных систем и оптимизация параметров культивирования в подобранных культурах клеток. В опытах использовали штамм «Вологда/2019» вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота, выделенный из биологического материала, полученного от теленка с признаками респираторной патологии. Штамм адаптирован к перевиваемой культуре клеток слизистой носовых перегородок крупного рогатого скота (ВТ) и депонирован в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Установлено, что перевиваемые линии клеток трахеи эмбриона крупного рогатого скота (FBT) и почки теленка (RBT) являются наиболее чувствительными клеточными системами для репродукции респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019», в данных культурах клеток отмечалось максимальное накопление вируса. Цитопатическая активность вируса в культуре клеток FBT на 4–5 сут культивирования составила от $4,78 \pm 0,18$ до $5,50 \pm 0,16$ Ig ТЦД₅₀/см³, а в клеточной системе RBT – от $4,00 \pm 0,23$ до $4,75 \pm 0,20$ Ig ТЦД₅₀/см³. Определено, что при множественности заражения культур клеток FBT и RBT вирусом в $0,1$ Ig ТЦД₅₀/кл, использовании в составе поддерживающей питательной среды 2% глутамина, а также 2% сыворотки крови лошади либо крупного рогатого скота удается получить вирусный материал с высокой цитопатической активностью.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, штамм «Вологда/2019», культивирование, цитопатическая активность, титр вируса.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Кирпиченко В. В., Кононова С. В., Шумилова И. Н., Нестеров А. А., Туркова М. В., Бухон Е. А., Роменская Д. В., Спрыгин А. В., Манин Б. Л., Бьядовская О. П. Оптимизация параметров культивирования вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019». *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 170–178. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-170-178.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кирпиченко Владимир Владимирович, аспирант, референтная лаборатория болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: kirpichenko@arriah.ru.

UDC 619:578.231.31:636.22/.28:57.082.26

Optimization of cultivation parameters for bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019

V. V. Kirpichenko¹, S. V. Kononova², I. N. Shumilova³, A. A. Nesterov⁴, M. V. Turkova⁵, Ye. A. Bukhon⁶,
D. V. Romenskaya⁷, A. V. Sprygin⁸, B. L. Manin⁹, O. P. Byadovskaya¹⁰

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

¹ ORCID 0000-0002-2494-3826, e-mail: kirpichenko@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3932-2416, e-mail: kononova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-6132-5771, e-mail: shumilova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-4288-1964, e-mail: nesterov@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-6598-7593, e-mail: turkova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-2989-7793, e-mail: buhon@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-2443-1898, e-mail: romenskaya@arriah.ru

⁸ ORCID 0000-0001-5982-3675, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁹ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin@arriah.ru

¹⁰ ORCID 0000-0002-8326-7151, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

SUMMARY

There are currently many controversial issues in the study of bovine respiratory syncytial infection. In this regard, it is relevant to study the biological properties of the virus, optimize the methods of its cultivation and select the most technologically advanced methods of designing diagnostic and prevention tools for this disease. The aim of this work was to select sensitive cell systems and to optimize the cultivation parameters in selected cell cultures. The Vologda/2019 strain of the bovine respiratory syncytial infection virus isolated from biological material obtained from a calf with respiratory symptoms was used in the experiment. The strain was adapted to the continuous cell culture derived from bovine turbinate tissue (BT) and deposited in the State collection of microorganism strains at FGBI "ARRIAH". It was established that the continuous cell lines of fetal bovine trachea (FBT) and calf kidney (RBT) are the most sensitive cell systems for the reproduction of the bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019, the maximum accumulation of the virus was observed in these cell cultures. The cytopathic activity of the virus in the FBT cell culture ranged from 4.78 ± 0.18 to 5.50 ± 0.16 lg TCID₅₀/cm³, and in the RBT cell culture – from 4.00 ± 0.23 to 4.75 ± 0.20 lg TCID₅₀/cm³ at days 4–5 of cultivation. It was determined that in case of multiplicity of inoculation of FBT and RBT cell cultures with the virus at 0.1 lg TCD₅₀/cell and the use of 2% glutamine in the maintenance nutrient medium, as well as 2% horse or cattle blood serum, it is possible to obtain virus material with high cytopathic activity.

Key words: bovine respiratory syncytial virus, Vologda/2019 strain, cultivation, cytopathic activity, virus titer.

Acknowledgements: The experiment was carried out at the expense of the FGBI "ARRIAH" in the framework of the research topic "Animal Welfare".

For citation: Kirpichenko V. V., Kononova S. V., Shumilova I. N., Nesterov A. A., Turkova M. V., Bukhon Ye. A., Romenskaya D. V., Sprygin A. V., Manin B. L., Byadovskaya O. P. Optimization of cultivation parameters for bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 170–178. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-170-178.

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

For correspondence: Vladimir V. Kirpichenko, Post-Graduate Student, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: kirpichenko@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в животноводство промышленных методов, с одной стороны, привело к увеличению продуктивности животных, с другой – способствовало появлению таких серьезных проблем, как возникновение благоприятных условий для массового распространения инфекционных заболеваний. Ведущую позицию среди самых распространенных заболеваний крупного рогатого скота занимают респираторные болезни [1]. Они могут возникать как самостоятельно (парагрипп-3, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, аденовирусы, респираторно-синцитиальная инфекция), так и в различных ассоциациях вирусной и бактериальной этиологии, нанося огромный экономический ущерб животноводству [2–4].

В настоящее время респираторно-синцитиальная инфекция (РСИ) крупного рогатого скота (КРС) зарегистрирована во многих странах мира (Япония, Германия, США, Хорватия, Бельгия), в том числе с 1975 г. и в России [4–6].

Возбудитель РСИ КРС относится к семейству *Pneumoviridae*, роду *Orthopneumovirus*, виду *Bovine orthopneumovirus*. К вирусу восприимчивы КРС всех пород, а также буйволы, туры, яки, бизоны, зебу и т. д. По данным большинства отечественных и зарубежных

авторов, наиболее подвержены заболеванию РСИ КРС телята в возрасте от одного месяца до года. Однако у молодняка до 4-недельного возраста заболевание встречается реже. Возможно, данный факт связан с более ответственным отношением к новорожденным телятам и более тщательным уходом за ними. Имеются данные о возникновении вспышек и среди взрослого КРС, что может быть связано с механическим заносом возбудителя в стадо, где не применялись профилактические меры для предупреждения заноса РСИ КРС. К таким случаям можно отнести закупку инфицированного скота, использование при транспортировке несертифицированных перегонных участков и т. д. Инкубационный период составляет от 2 до 5 сут. Различают три формы течения болезни: субклиническую, острую и сверхострую [7].

Источником инфекции зачастую являются больные или ранее переболевшие животные. Наиболее вероятными способами передачи вируса считается аэрогенный или контактный, через выделение из глаз, носа и слюнистой оболочки трахеи. Ряд авторов показали, что внутриутробная инфекция способствует циркуляции респираторно-синцитиального вируса в стаде. Данных о передаче возбудителя РСИ КРС со спермой нет, эта область пока остается малоизученной [6, 8, 9].

В настоящее время многие вопросы течения инфекции также остаются недостаточно изученными. Известно, что вирус РСИ КРС размножается в клетках органов респираторного тракта, однако имеются данные отечественных авторов об адаптации этого вируса к культурам клеток почек и тестикул КРС [2, 7, 10].

Диагноз на РСИ КРС ставят на основании эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований. Лабораторная диагностика включает обнаружение специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) или в реакции нейтрализации, идентификация генома респираторно-синциального вируса в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), выделение вируса из биологического материала от животных культуральными методами [2, 3, 8]. Как правило, материалом для исследования служат сыворотки крови, пробы носовых выделений, трахеальные и бронхиальные экссудаты, кусочки легкого и бронхов [5, 10, 11].

Выделение вируса РСИ КРС в культуре клеток чаще всего затруднено ввиду его лабильности и неустойчивости в условиях внешней среды [7, 8]. Результат выделения вируса в культуре клеток и его дальнейшая идентификация в ПЦР или ИФА во многом зависят от правильного отбора, хранения и транспортировки проб биоматериала от больных животных [10]. Для выделения вируса, согласно данным отечественных и зарубежных авторов, используют первично трипсинизированные культуры клеток эмбриона КРС (ПЭК, ЛЭК и т. д.) [7–9].

При диагностике РСИ КРС наиболее перспективной является ОТ-ПЦР-РВ в сочетании с ретроспективными серологическими методами [9]. Следует отметить, что вирусологические методы являются важным звеном при разработке диагностических систем и средств специфической профилактики заболевания. При производстве качественных тест-систем, наборов, вакцин и специфических сывороток крайне важно получить высокоактивный культуральный вирусный материал [2, 3, 12].

Таким образом, представляется актуальным изучение биологических свойств вируса, оптимизация культивирования и подбор компонентов для создания средств диагностики и профилактики данного заболевания.

Целью настоящей работы являлась оптимизация параметров культивирования вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в подобранных ранее чувствительных клеточных системах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019», выделенный из биологического материала, полученного от телят с признаками респираторной патологии, и адаптированный к перевиваемой линии культуры клеток слизистой носовых перегородок КРС (ВТ) с титром цитопатической активности $4,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В 2019 г. полученный штамм «Вологда/2019» вируса РСИ КРС был депонирован в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

С целью изучения культуральных свойств вируса РСИ КРС указанного штамма и его адаптации к высоко-технологичным линиям культур клеток использовали

следующие культуральные системы животных клеток: почки телят (RBT), слизистых носовых перегородок эмбриона КРС (FBN), трахеи эмбриона КРС (FBT), почки макаки-резуса (MA-104), яичников домашней козы (ЯДК-04) [13].

Для культивирования вируса РСИ КРС в перевиваемых клеточных линиях использовали 24-часовой монослой клеток, выращенных в пластиковых матрасах объемом от 25 до 175 см³. Исходная концентрация клеток в клеточной суспензии составляла 100–300 тыс./см³. В культуру клеток инокулировали вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл. Время культивирования составляло 6–8 сут (при условии сохранения целостности монослоя).

Чувствительность перевиваемых культур клеток к вирусу РСИ КРС штамма «Вологда/2019» определяли методом последовательных пассажей [12]. С этой целью заражение культуры проводили с предварительной адсорбцией вируса на клетках монослоя без добавления поддерживающей питательной среды.

Инокуляцию вируса проводили после удаления ростовой питательной среды, далее на 1,5 ч оставляли вирус для контакта с клеточным монослоем в СО₂-инкубаторе при температуре 37 °С, а затем добавляли поддерживающую полусинтетическую питательную среду (ПСС) с содержанием в ней по 2% сыворотки крови животных (коровы или лошади) и глутамина. Сбор вирусного сырья проводили при проявлении цитопатического действия (ЦПД) на 70–80% площади клеточного монослоя. Полученный вирус хранили при минус 80 °С. Цитопатическую активность вируса проверяли путем микротитрования вируса [12] в культурах клеток ВТ или FBT. Отличительной особенностью в данном исследовании являлось то, что вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019» инокулировали на уже выращенный 24-часовой клеточный монослой.

Микротитрование вируса РСИ КРС каждого пассажа проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах в объеме 0,2 см³ на лунку. Для этого предварительно в стерильных пробирках типа Эппендорф готовили разведения вирусосодержащего материала (ВСМ) на среде ПСП (от 10⁻¹ до 10⁻⁸) [12]. Подготовленные разведения вируса, начиная с наивысшего, переносили одноканальным механическим дозатором в лунки культурального планшета с выращенным монослоем культур клеток FBT или ВТ по 0,1 см³ на лунку. Для адсорбции вируса на клетках монослоя планшет помещали в СО₂-инкубатор с содержанием 5% диоксида углерода и температурой 37 °С на 1,5 ч. После контакта вируса и клеточного монослоя добавляли 0,1 см³ питательной среды ПСС с содержанием в ней по 2% сыворотки крови лошади и глутамина. Наблюдение вели с использованием инвертируемого микроскопа Olympus CKX53 (при увеличении от ×40 до ×400) и цветовых фазово-контрастных слайдеров теплого и холодного спектра для увеличения резкости изображения. Учет результатов титрования вируса проводили через 10 сут инкубирования при условии сохранения целостности монослоя клеток в контрольных лунках [12].

Расчет ЦПД проводили по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³ [12].

Определение титра антигена вируса РСИ КРС в инактивированных препаратах проводили с помощью коммерческого набора для выявления антигена

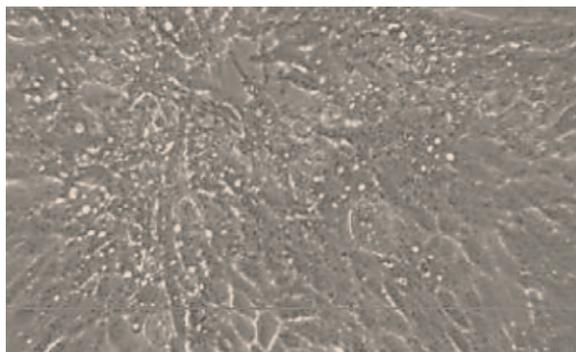


Рис. 1. Культура клеток RBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (3-и сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 1. BRSV-inoculated RBT cell culture (day 3, $\times 400$ magnification)

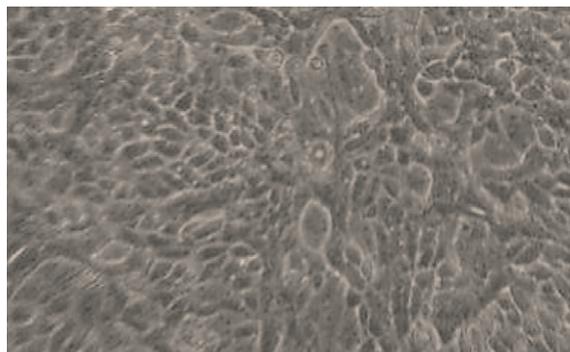


Рис. 2. Культура клеток RBT без инокуляции вируса РСИ КРС (3-и сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 2. Non-BRSV-inoculated RBT cell culture (day 3, $\times 400$ magnification)

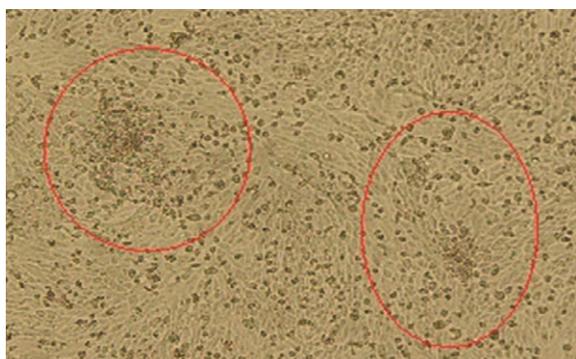


Рис. 3. Культура клеток RBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (5-е сут, увеличение $\times 200$)

Fig. 3. RBT cell culture inoculated with BRSV (day 5, $\times 200$ magnification)

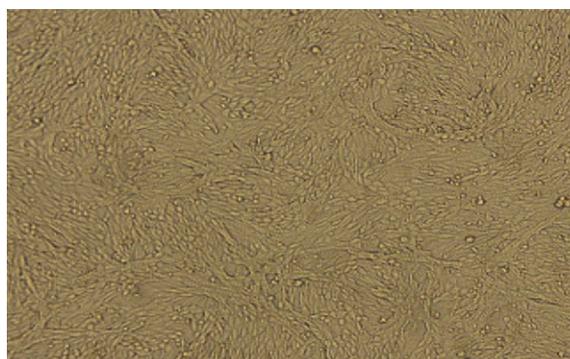


Рис. 4. Культура клеток RBT без инокуляции вируса РСИ КРС (5-е сут, увеличение $\times 200$)

Fig. 4. RBT cell culture not inoculated with BRSV (day 5, $\times 200$ magnification)

РСИ КРС в ИФА (ELISA kit for antigenic diagnosis of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV); Bio-X Diagnostics, Бельгия) согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения чувствительности различных культур клеток к вирусу РСИ КРС штамма «Вологда/2019» было проведено пять последовательных пассажей в культуральных системах RBT, FBN, FBT, МА-104 и ЯДК-04.

Развитие ЦПД вируса во всех культурах клеток было различным. Через 3-и сут в культуре RBT отмечали локальные поражения отдельных клеток и/или групп клеток (рис. 1, 2).

К 4–5-м сут в культуре клеток RBT формировались локальные очаги ЦПД, вызванные влиянием размножающегося вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019», основной «рисунок» монослоя сглаживался за счет деформации клеток, а в суспензию откреплялось большое количество клеток и их структурных элементов (рис. 3). На рисунке 4 наглядно видна разница между условно чистой и инокулированной культурой, т. е. практически отсутствует отслаивание клеток в суспензию, нет очагов поражения, рисунок монослоя резкий, отчетливо различимы отдельные клетки.

На 7–8-е сут проявление ЦПД вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культуре клеток RBT достигало 70–80%. Монослой разряжался, клетки разрушались, обра-

зовывались «дыры» (рис. 5). При наблюдении подобной картины вирусосодержащий материал замораживали при минус 80°C и оставляли на хранение. На рисунке 6 представлен контроль без инокуляции вируса.

В культуре клеток FBT к 4-м сут культивирования вируса были видны очаги поражения, состоящие из скопления разрушенных или деформированных клеток (рис. 7). На рисунке 8 представлен контроль без инокуляции вируса.

При проведении дальнейших исследований проявления ЦПД вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» становилось более выраженным. К 3-му passage на 7-е сут культивирования в культуре клеток FBT наблюдали 80%-е разрушение монослоя с образованием конгломератов и синцитий (рис. 9). При наблюдении подобной картины ВСМ замораживали при минус 80°C и оставляли на хранение. На рисунке 10 представлен контроль без инокуляции вируса.

В культурах клеток МА-104 и FBN ЦПД вируса не отмечали, определение титра вируса в ИФА позволило подтвердить, что в данных клеточных системах вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019» не репродуцируется (снижение титра в процентном эквиваленте). На уровне 4–5-го пассажей каких-либо изменений в клеточном монослое культур МА-104 и FBN не наблюдали.

В культуре клеток ЯДК-04 ЦПД вируса проявлялось редким округлением клеток и разряжением монослоя.

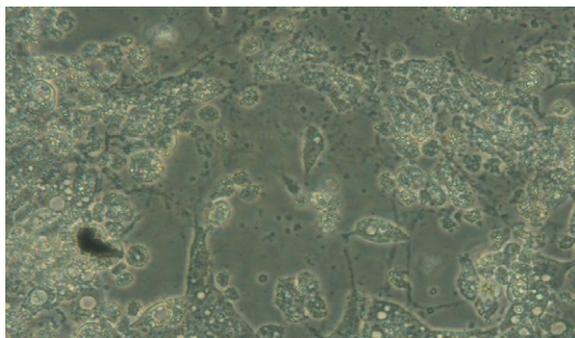


Рис. 5. Культура клеток RBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 200$)

Fig. 5. BRSV-inoculated RBT cell culture (day 7, $\times 200$ magnification)

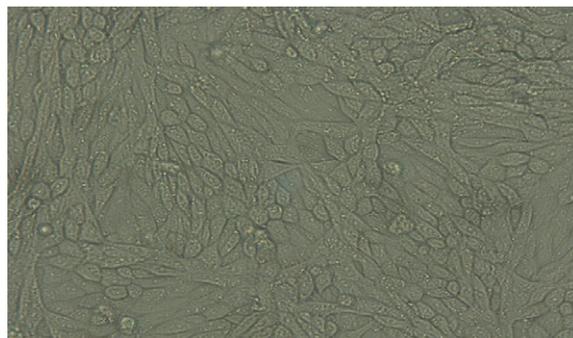


Рис. 6. Культура клеток RBT без инокуляции вируса РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 6. Non-BRSV-inoculated RBT cell culture (day 7, $\times 400$ magnification)

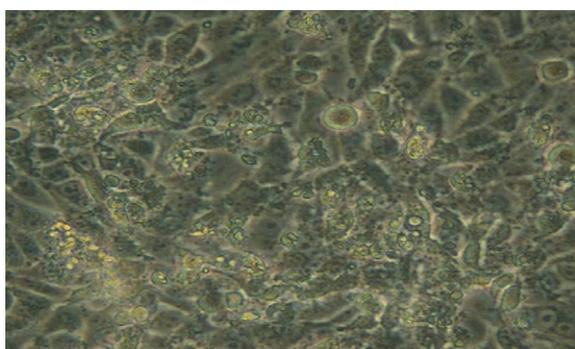


Рис. 7. Культура клеток FBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (4-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 7. BRSV-inoculated FBT cell culture (day 4, $\times 400$ magnification)

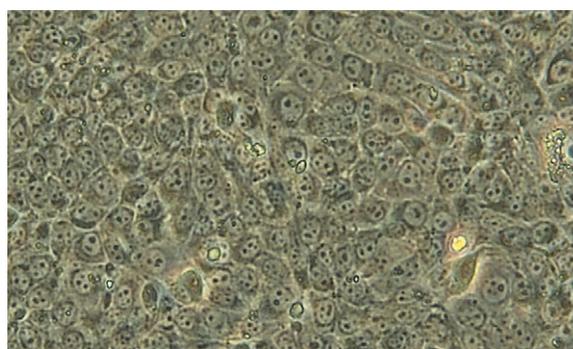


Рис. 8. Культура клеток FBT без инокуляции вируса РСИ КРС (4-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 8. Non-BRSV-inoculated FBT cell culture (day 4, $\times 400$ magnification)

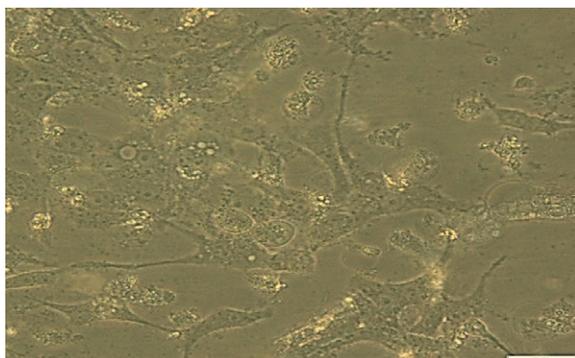


Рис. 9. Культура клеток FBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 9. BRSV-inoculated FBT cell culture (day 7, $\times 400$ magnification)

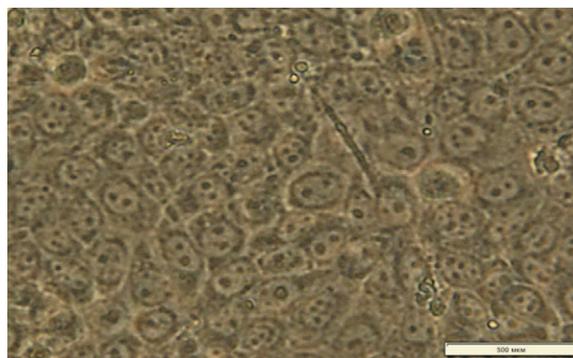


Рис. 10. Культура клеток FBT без инокуляции вируса РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 10. Non-BRSV-inoculated FBT cell culture (day 7, $\times 400$ magnification)

Методом микротитрования удалось установить, что вирус стабильно размножается в данной клеточной системе, однако прироста вирусной массы, как в культурах клеток RBT и FBT, не происходит. Данный факт свидетельствует о необходимости оптимизации параметров культивирования для достижения лучшего результата.

Определение титра вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в каждом из пассажей проводили методом микротитрования в культуре клеток VT, а подтверж-

дение специфичности полученных препаратов вируса РСИ КРС – методом ИФА (табл. 1).

В ходе исследований было отмечено, что при культивировании вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культуре клеток FBT характерное ЦПД наблюдали на 4–5-е сут при проведении 3–5 пассажей. Уровень ЦПД вируса к 5-му пассажу постепенно увеличивался до $5,50 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В ИФА титр вируса РСИ КРС на 1-м пассаже составил 1:2, а на 5-м пассаже – 1:64. При

культивировании вируса РСИ КРС в культуре клеток RBT наблюдали аналогичную тенденцию: на 4–5-е сут культивирования (5-й пассаж) титр вируса составлял $4,75 \pm 0,20 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в ИФА увеличился до 1:32.

Инокуляция вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в клеточных системах МА-104 и FBN привела к снижению его активности до $1,50 \pm 0,17 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а на 4–5-м пассаже вирус обнаружен не был. Аналогичное снижение титра вируса было подтверждено и в ИФА.

При культивировании вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культуре клеток ЯДК-04 отмечали стабильную активность вируса на протяжении всех 5 пассажей ($2,50 \pm 0,17 - 3,33 \pm 0,18 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). Возможно, при оптимизации параметров культивирования в клеточной системе ЯДК-04 удастся получить более высокую цитопатическую активность вируса. Титр вируса в ИФА для данного вирусного сырья составил 1:2 на 1-м пассаже и 1:4 на последующих, что является стабильным результатом, но недостаточным для наработки качественного вирусосодержащего препарата.

В ходе исследований было установлено, что наиболее приемлемыми клеточными системами для репродукции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» являются культуры клеток RBT и FBT. Клеточные системы МА-104 и FBN оказались непригодными для наработки вирусной массы и репродукции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019».

С целью увеличения титра вируса необходимо было подобрать оптимальные дозы для заражения культур клеток. Для этого были отобраны наиболее перспективные клеточные системы RBT и FBT. Для проведения инокуляции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в подобранные культуры клеток вирусосодержащий материал был разведен до значений от 0,001 до 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ (рис. 11).

Как видно из рисунка 11, при множественности заражения 0,001 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ цитопатическая активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культурах клеток FBT и RBT составляла 2,50 и 2,75 $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. При множественности инфицирования 0,01 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ цитопатическая активность данного вируса в клеточных системах FBT и RBT составляла 4,00 и 3,25 $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Также при данной дозе заражения отмечали более медленное накопление вируса в культурах клеток RBT и FBT, время культивирования для достижения 80% разрушения монослоя вирусом РСИ КРС составило 9 и 12 сут соответственно. Учитывая устойчивость клеточных систем к старению и отмиранию (18 сут до начала деградации клеток для FBT и 16 сут – для RBT), данный результат можно считать приемлемым. Однако результаты исследования показали, что при увеличении множественности заражения до 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ 80%-е разрушение монослоя и накопление вируса в культурах клеток RBT и FBT шло быстрее (4-е и 5-е сут соответственно), при этом титр цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» составил $4,75 \pm 0,16$ и $5,50 \pm 0,80 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Поэтому данная множественностью инфицирования является оптимальной.

С целью оптимизации состава питательной среды ПСС, используемой при инокуляции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в качестве поддерживаемой, было решено оценить эффект от добавления глутамин, показанный ранее Т. Ю. Кочиш [1], с различной концентрацией исходного тестируемого вещества (табл. 2).

Таблица 1
Титр вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в различных культурах клеток ($n = 3$)

Table 1
Titers of BRSV strain Vologda/2019 in various cell cultures ($n = 3$)

Культура клеток	Номер пассажа	Время культивирования, сут	Титр вируса, $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Титр вируса в ИФА, разведение
RBT	1	8–10	$3,00 \pm 0,25$	1:2
	2	8–10	$3,63 \pm 0,07$	1:4
	3	7–10	$3,56 \pm 0,06$	1:4
	4	4–5	$4,00 \pm 0,23$	1:16
	5	4–5	$4,75 \pm 0,20$	1:32
FBT	1	8–10	$3,63 \pm 0,15$	1:2
	2	8–10	$4,00 \pm 0,22$	1:4
	3	7–10	$4,33 \pm 0,23$	1:4
	4	4–5	$4,78 \pm 0,18$	1:32
	5	4–5	$5,50 \pm 0,16$	1:64
МА-104	1	10	$1,83 \pm 0,16$	1:2
	2	10	$1,67 \pm 0,16$	1:2
	3	10	$1,50 \pm 0,17$	1:2
	4	10	н/о	–
	5	10	н/о	–
FBN	1	10	$2,23 \pm 0,23$	1:2
	2	10	$1,67 \pm 0,10$	1:2
	3	10	$1,50 \pm 0,17$	1:2
	4	10	н/о	–
	5	10	н/о	–
ЯДК-04	1	9	$2,50 \pm 0,17$	1:2
	2	10	$3,25 \pm 0,25$	1:4
	3	9	$3,12 \pm 0,18$	1:4
	4	8	$3,16 \pm 0,17$	1:4
	5	9	$3,33 \pm 0,18$	1:4

н/о – не обнаружено (not detected);

«–» – отрицательный результат (negative result).

Согласно данным таблицы 2, обогащение питательной среды глутамином привело к постепенному увеличению цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019». В культуре клеток RBT при добавлении в питательную среду 0,1 и 0,5% глутамин титр вируса увеличивался от $3,00 \pm 0,25$ до $3,56 \pm 0,06 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, что является относительно низким уровнем активности для данного вируса. В культуре клеток FBT при добавлении среды с содержанием 0,1 и 0,5% глутамин к 3-му пассажу удалось получить вирус с титром цитопатической активности $3,63 \pm 0,15$ и $4,00 \pm 0,12 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Было установлено, что наиболее оптимальной

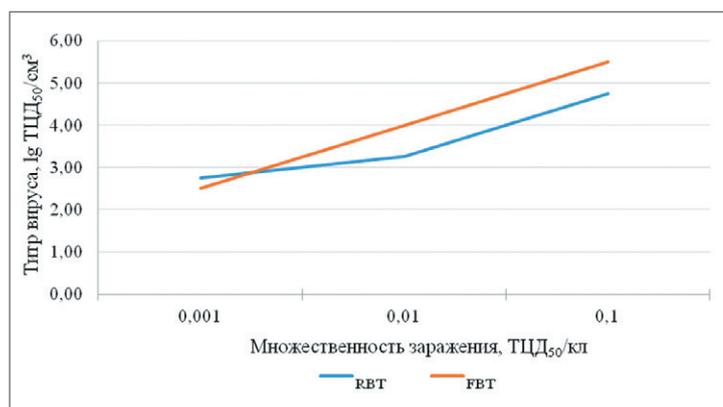


Рис. 11. Влияние множественности заражения на активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» ($n = 3$)

Fig. 11. Effects of inoculation multiplicity on the BRSV strain Vologda/2019 activity ($n = 3$)

концентрацией глутамина в питательной среде ПСС является 2%, при которой удалось добиться максимального титра цитопатической активности вируса РСИ КРС к 3-му пассажу: $4,75 \pm 0,20$ Ig ТЦД₅₀/см³ (RBT) и $5,50 \pm 0,08$ Ig ТЦД₅₀/см³ (FBT). Дальнейшее увеличение концентрации глутамина в питательной среде ПСС привело к снижению цитопатической активности вируса в рассматриваемых клеточных системах. При использовании среды без добавления глутамина в контрольных образцах титр вируса был на уровне от $3,00 \pm 0,25$ до $4,00 \pm 0,17$ Ig ТЦД₅₀/см³.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что обогащение питательной среды глутамином в концентрации 2% приводит к увеличению титра цитопатической активности вируса, а также сокращает время его максимального накопления в культурах клеток FBT и RBT.

Следующим этапом исследования было изучение влияния на репродукцию вируса сыворотки крови лошади и КРС в составе питательной среды ПСС.

Как известно, сыворотка крови КРС зачастую контаминирована различными вирусными агентами, в том числе вирусом вирусной диареи КРС, что может повли-

ять на накопление вирусной массы в культуре клеток и снизить цитопатическую активность изучаемого вируса [14]. Применение сыворотки крови лошади позволило бы исключить контаминацию вирусной суспензии данным пестивирусом и тем самым получить вирус с высокой биологической активностью.

При исследовании влияния концентрации испытуемых сывороток крови животных на активность вируса проводили 5 последовательных пассажей в культурах клеток RBT и FBT. Данные представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, при добавлении 0,1 и 0,5% сыворотки крови КРС в питательную среду ПСС уровень цитопатической активности вируса в культуре клеток RBT составил $3,25 \pm 0,25$ и $3,37 \pm 0,20$ Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно, а в культуре клеток FBT – $2,75 \pm 0,25$ и $3,25 \pm 0,08$ Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно. Постепенное увеличение концентрации сыворотки крови КРС в питательной среде от 1 до 2% привело к повышению титра цитопатической активности как в культуре клеток RBT ($4,33 \pm 0,12$ Ig ТЦД₅₀/см³), так и в культуре FBT ($4,75 \pm 0,25$ Ig ТЦД₅₀/см³). Дальнейшее увеличение концентрации сыворотки крови КРС привело к потере цитопатической активности вируса в обеих культурах, что может быть связано с лабильностью вируса и высокой чувствительностью к компонентам питательной среды.

При изучении влияния концентрации сыворотки крови лошади в питательной среде для культивирования вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» было установлено, что оптимальной дозой является 2%. При введении в среду данного количества сыворотки титр цитопатической активности вируса составил $4,50 \pm 0,23$ Ig ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток RBT и $5,50 \pm 0,16$ Ig ТЦД₅₀/см³ в культуре FBT, что является лучшим результатом в свете полученных данных. Добавление в питательную среду ПСС малой (0,1%) или большой (3%) дозы сыворотки крови лошади приводило к снижению титра цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019».

Таким образом, можно сделать вывод, что добавление сыворотки крови лошади или КРС благоприятно влияет на репродукцию вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019». Оптимальной концентрацией сыворотки крови КРС или лошади в питательной среде является 2%.

Таблица 2

Активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» при обогащении питательной среды глутамином ($n = 3$)

Table 2

BRSV strain Vologda/2019 activity in case of glutamine-enriched nutrient medium ($n = 3$)

Количество глутамина в поддерживающей среде, %	Цитопатическая активность вируса, Ig ТЦД ₅₀ /см ³					
	RBT			FBT		
	1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж	1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж
0,1	$3,00 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25$	$3,37 \pm 0,20$	$3,12 \pm 0,25$	$3,33 \pm 0,22$	$3,63 \pm 0,15$
0,5	$3,00 \pm 0,25$	$3,37 \pm 0,20$	$3,56 \pm 0,06$	$3,33 \pm 0,22$	$3,63 \pm 0,17$	$4,00 \pm 0,12$
1	$3,56 \pm 0,06$	$3,56 \pm 0,17$	$4,00 \pm 0,23$	$3,63 \pm 0,16$	$4,00 \pm 0,22$	$4,00 \pm 0,25$
2	$4,00 \pm 0,23$	$4,30 \pm 0,23$	$4,75 \pm 0,20$	$4,33 \pm 0,23$	$4,78 \pm 0,18$	$5,50 \pm 0,08$
3	$3,56 \pm 0,17$	$4,00 \pm 0,23$	$3,56 \pm 0,06$	$3,83 \pm 0,20$	$3,83 \pm 0,20$	$3,73 \pm 0,12$
Среда без глутамина	$3,37 \pm 0,20$	$3,00 \pm 0,25$	$3,56 \pm 0,06$	$3,33 \pm 0,27$	$3,63 \pm 0,12$	$4,00 \pm 0,17$

Таблица 3
Влияние концентрации сыворотки крови в питательной среде на активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» (n = 5)

Table 3
Effect of blood sera concentration in the nutrient medium on BRSV strain Vologda/2019 activity (n = 5)

Концентрация сыворотки крови в питательной среде, %	Цитопатическая активность вируса, Ig ТЦД ₅₀ /см ³			
	RBT		FBT	
	сыворотка крови КРС	сыворотка крови лошади	сыворотка крови КРС	сыворотка крови лошади
0,1	3,25 ± 0,25	3,50 ± 0,15	2,75 ± 0,25	3,63 ± 0,15
0,5	3,37 ± 0,20	3,00 ± 0,25	3,25 ± 0,08	4,00 ± 0,12
1	4,30 ± 0,23	4,00 ± 0,23	3,56 ± 0,19	4,00 ± 0,25
2	4,33 ± 0,12	4,50 ± 0,23	4,75 ± 0,25	5,50 ± 0,16
3	4,00 ± 0,23	3,56 ± 0,17	4,00 ± 0,23	3,73 ± 0,12
Среда без сыворотки крови	3,00 ± 0,25	3,37 ± 0,20	3,50 ± 0,33	4,00 ± 0,17

При добавлении указанного количества сыворотки удалось достичь максимальной цитопатической активности данного вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении чувствительности перевиваемых культур клеток к вирусу РСИ КРС штамма «Вологда/2019» установлено, что эффективными системами для получения высокоактивной вирусной суспензии являются культуры RBT и FBT. Указанные линии культур клеток могут быть использованы для получения вирусного материала с целью разработки средств диагностики и специфической профилактики данного заболевания.

Оптимальной дозой заражения культур клеток является 0,1 ТЦД₅₀/кл, при которой титр вируса составил 4,75 ± 0,16 Ig ТЦД₅₀/см³ для RBT и 5,50 ± 0,80 Ig ТЦД₅₀/см³ для FBT.

Обогащение питательной среды глутамином в концентрации 2% приводит к увеличению титра вируса при культивировании в указанных клеточных системах.

Добавление сыворотки крови лошади или КРС благоприятно влияет на цитопатическую активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019». Установлено, что оптимальной концентрацией сыворотки крови в питательной среде является 2%. При добавлении данного количества сыворотки удалось достичь максимальной цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 12, 13 см. REFERENCES)

1. Кочиш Т. Ю. Разработка набора реагентов для определения уровня антител к респираторно-синцициальному вирусу крупного рогатого скота в иммуноферментном анализе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Щелково; 2004. 23 с.
2. Баженов К. С. Распространение вирусов парагриппа-3 и респираторно-синцициальной инфекции среди телят на откорме в осенне-зимний период. *Бюллетень ВИЭВ*. 1983; 50: 6–8.
3. Гуненков В. В., Халенев Г. А., Сюрин В. Н. Респираторно-синцициальная вирусная инфекция *Животноводство и ветеринария*. 1975; 8: 70–76.
4. Респираторно-синцициальная инфекция крупного рогатого скота: рекомендации. Сост.: А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, С. В. Котенева,

А. В. Нефедченко, К. В. Войтова, О. В. Кунгурцева, И. Я. Строганова. Новосибирск: Сибирское отделение Россельхозакадемии; ГНУ ИЭВСидВ; 2010. 26 с. eLIBRARY ID: 19518328.

5. Глотов А. Г., Петрова О. Г., Глотова Т. И., Нефедченко А. В., Татарчук А. Т., Кушнир Н. И. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; 3: 17–21. eLIBRARY ID: 22435011.

6. Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП; 1998. 928 с.

7. Строганова И. Я., Войтова К. В. Методы обнаружения и идентификации респираторно-синцициального вируса крупного рогатого скота в культуре клеток. *Вестник КрасГАУ*. 2011; 3: 128–133. eLIBRARY ID: 16445217.

8. Глотов А. Г., Глотова Т. И. Респираторно-синцициальная инфекция крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2009; 11: 18–23. eLIBRARY ID: 12968708.

9. Журавлева Е. А. Нозоареал респираторно-синцициальной инфекции крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2018; 12: 3–8. DOI: 10.30896/0042-4846.2018.12.03-08.

10. Кононова С. В., Нестеров А. А., Думова В. В., Манин Б. Л., Кононов А. В., Бабин Ю. Ю., Губенко О. Г. Адаптация вируса болезни Шмалленберга к перевиваемым клеточным культурам. *Ветеринария сегодня*. 2015; 2 (13): 17–21. eLIBRARY ID: 24345887.

11. Манин Б. Л., Коропова Н. В., Кузнецова Е. Г., Лабзова М. Н., Хлебопашникова С. В. Линия клеток почки телят *Bos taurus* RBT (Rene *Bos taurus*) для репродукции вирусов животных. Патент № 2488631 Российская Федерация, МПК С12N 5/07 (2010.01), А61К 39/12 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2012126700/10. Заявл. 26.06.2012. Оpubл. 27.07.2013. Бюл. № 21. Режим доступа: https://patents.s3.yandex.net/RU2488631C1_20130727.pdf.

14. Пономарев А. П., Манин Б. Л., Коган М. М. Культивирование клеточных линий человека и животных с использованием сыворотки крови, очищенной лантаноидами. *Ветеринарная патология*. 2019; 4: 61–70. eLIBRARY ID: 41560805.

REFERENCES

1. Kochish T. Yu. Development of a set of reagents for determining the level of antibodies to bovine respiratory syncytial virus using ELISA [Razrabotka nabora reagentov dlya opredeleniya urovnya antitel k respiratorno-sincital'nomu virusu krupnogo rogatogo skota v immunofermentnom analize]: author's abstract ... Candidate of Science (Biology). Shchyolkovo; 2004. 23 p. (in Russian)
2. Bazhenov K. S. Spread of parainfluenza-3 and respiratory syncytial viruses in fattening calves in autumn-winter season [Rasprostraneniye virusov paragrippa-3 i respiratorno-sincital'noj infekcii sredi telyat na otkorme v osenno-zimnij period]. *Bulletin of the All-Russia Institute for Experimental Veterinary Medicine (VIEV)*. 1983; 50: 6–8. (in Russian)
3. Gunenkov V. V., Khalenev G. A., Syurin V. N. Respiratory syncytial virus infection [Respiratorno-sincital'naya virusnaya infekciya]. *Zhivotnovodstvo i Veterinariya*. 1975; 8: 70–76. (in Russian)
4. Bovine respiratory syncytial infection [Respiratorno-sincital'naya infekciya krupnogo rogatogo skota]: recommendations. Compiled by:

A. G. Glotov, T. I. Glotova, S. V. Koteneva, A. V. Nefedchenko, K. V. Voytova, O. V. Kungurtseva, I. Ya. Stroganova. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Agricultural Academy; Institute of Experimental Veterinary Medicine for Siberia and Far East; 2010. 26 p. eLIBRARY ID: 19518328. (in Russian)

5. Glotov A. G., Petrova O. G., Glotova T. I., Nefedchenko A. V., Tatarchuk A. T., Kushnir N. I., et al. Spread of bovine viral respiratory diseases [Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота]. *Veterinariya*. 2002; 3: 17–21. eLIBRARY ID: 22435011. (in Russian)

6. Syurin V. N., Samuylenko A. Ya., Solovyov B. V., Fomina N. V. Animal viral diseases [Вирусные болезни животных]. М.: All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry; 1998. 928 p. (in Russian)

7. Stroganova I. Ya., Voitova K. V. The techniques for revealing and identification of the respiratory and syncytial virus of cattle in cell culture. *Bulletin of KSAU*. 2011; 3: 128–133. eLIBRARY ID: 16445217. (in Russian)

8. Glotov A. G., Glotova T. I. Respiratory syncytial virus (BRSV). *Veterinariya*. 2009; 11: 18–23. eLIBRARY ID: 12968708. (in Russian)

9. Zhuravleva E. A. Nososemia of bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinariya*. 2018; 12: 3–8. DOI: 10.30896/0042-4846.2018.12.12.03-08. (in Russian)

10. Kononova S. V., Nesterov A. A., Dumova V. V., Manin B. L., Kononov A. V., Babin Yu. Yu., Gubenko O. G. Adaptation of Schmallenberg virus to continuous cell cultures. *Veterinary Science Today*. 2015; 2 (13): 17–21. eLIBRARY ID: 24345887. (in Russian)

11. Manin B. L., Koropova N. V., Kuznetsova Ye. G., Labzova M. N., Khlebopashnikova S. V. Bovine calf kidney cell line *Bos taurus* RBT (Rene *Bos taurus*) for animal virus reproduction [Liniya kletok pochki telenki *Bos taurus* RBT (Rene *Bos taurus*) dlya reprodukcii virusov zhitovnyh]. Patent No. 2488631 Russian Federation, IPC C12N 5/07 (2010.01), A61K 39/12 (2006.01). FGBl "ARRIAH". No. 2012126700/10. Submitted on 26.06.2012. Published on 27.07.2013. Bulletin No. 21. Available at: https://patents.s3.yandex.net/RU2488631C1_20130727.pdf. (in Russian)

12. Murray G. M., More S. J., Sammin D., Casey M. J., McElroy M. C., O'Neill R. G., et al. Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017; 29 (1): 20–34. DOI: 10.1177/1040638716674757.

13. Valarcher J.-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007; 38 (2): 153–180. DOI: 10.1051/vetres:2006053.

14. Ponomarev A. P., Manin B. L., Kogan M. M. Cultivation of human and animal cell lines using blood serum purified by lanthanoids. *Veterinarnaya patologiya*. 2019; 4: 61–70. eLIBRARY ID: 41560805. (in Russian)

Поступила 15.06.2020

Принята в печать 22.07.2020

Received on 15.06.2020

Approved for publication on 22.07.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кирпиченко Владимир Владимирович, аспирант, референтная лаборатория болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Кононова Светлана Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шумилова Ирина Николаевна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Нестеров Александр Александрович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Туркова Мария Владимировна, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бухон Елена Александровна, ведущий биолог референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Роменская Диана Витальевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий сектором отдела образования и научно-методической работы ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Спрыгин Александр Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Манин Борис Леонидович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора культуры клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бядовская Ольга Петровна, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Vladimir V. Kirpichenko, Post-Graduate Student, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Svetlana V. Kononova, Candidate of Sciences (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Irina N. Shumilova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexander A. Nesterov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Maria V. Turkova, Leading Veterinarian, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yelena A. Bukhon, Leading Biologist, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Diana V. Romenskaya, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Sector, Department for Education and Science Methodology, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexander V. Sprygin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Boris L. Manin, Candidate of Sciences (Biology), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga P. Byadovskaya, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Базовая скорость репродукции для некоторых инфекционных заболеваний свиней: оценка необходимого уровня вакцинации или депопуляции восприимчивого поголовья животных

В. М. Гуленкин¹, Ф. И. Коренной², А. К. Караулов³

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

¹ ORCID 0000-0002-3607-2765, e-mail: gulenkin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-7378-3531, e-mail: korennoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Одной из основных количественных характеристик в эпидемиологии/эпизоотологии инфекционных заболеваний человека и животных является базовая скорость репродукции (R_0). Данный показатель отражает как биологические свойства самого инфекционного агента, социально-экономические способы ведения животноводства, природные факторы обитания той популяции животных, в которую внедряется вирус (микроб), так и эффективность выбора методов борьбы с инфекцией, включая проведение профилактических мероприятий, а также позволяет предвидеть количество и вероятность возможного появления новых вторичных очагов инфекции в зоне риска распространения заболевания. В работе представлены данные по оценке базовой скорости репродукции (R_0) для ряда инфекционных болезней свиней. Проведен систематический анализ имеющихся публикаций по оценке этого показателя для различных изолятов вирусов африканской чумы свиней, классической чумы свиней, ящура, репродуктивно-респираторного синдрома свиней, болезни Ауески, гепатита E, энцефаломиокардита, цирковируса типа 2, а также актинобациллезной плеввропневмонии и заболеваний, вызываемых патогенными изолятами *Mycoplasma hyopneumoniae*. На основе полученных количественных значений показателя R_0 даны рекомендации ветеринарным службам по проведению профилактической вакцинации свиней от перечисленных заболеваний в зонах риска распространения инфекции. Определены необходимые условия по депопуляции дикого кабана для предотвращения возникновения новых очагов африканской чумы свиней: уничтожение за время, равное одному инфекционному периоду, не менее 75% обитающей в угрожаемой зоне популяции животных.

Ключевые слова: инфекционные болезни свиней, базовая скорость репродукции (R_0), вакцинация, депопуляция, дикие кабаны.

Благодарность: Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования научно-исследовательских работ по теме «Изучение и оценка распространения заразных болезней животных на территории Российской Федерации и подготовка прогнозов и материалов для формирования досье и подтверждения благополучия субъектов Российской Федерации требованиям Кодекса наземных животных в МЭБ (ящур, КПП, ЧМЖ, ГЭ)» (№081-00008-20-00 от 19.12.2019).

Для цитирования: Гуленкин В. М., Коренной Ф. И., Караулов А. К. Базовая скорость репродукции для некоторых инфекционных заболеваний свиней: оценка необходимого уровня вакцинации или депопуляции восприимчивого поголовья животных. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 179–185. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-179-185.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Гуленкин Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, заведующий сектором ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: gulenkin@arriah.ru.

Basic reproduction number for certain infectious porcine diseases: estimation of required level of vaccination or depopulation of susceptible animals

V. M. Gulenkin¹, F. I. Korennoy², A. K. Karaulov³

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

¹ ORCID 0000-0002-3607-2765, e-mail: gulenkin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-7378-3531, e-mail: korennoy@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-5731-5762, e-mail: karaulov@arriah.ru

SUMMARY

Basic reproduction number (R_0) is one of the fundamental quantitative characteristics in epidemiology of infectious human and animal diseases. This parameter reflects the biological properties of the infectious agent, the social and economic aspects of animal husbandry, natural factors associated with the habitat of the animal population invaded by the virus (microorganism), as well as the effectiveness of methods selected for infection control, in particular, the implementation of preventive measures; it also allows foreseeing the number and probability of occurrence of new secondary outbreaks in the area at risk of the disease spread. The paper presents data on the estimation of basic reproduction number (R_0) for a range of infectious porcine diseases. A systematic analysis has been undertaken with respect to the publications available on the estimation of R_0 for various virus isolates of African swine fever, classical swine fever, foot-and-mouth disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, Aujeszky's disease, hepatitis E, encephalomyocarditis, porcine circovirus type 2, as well as pleuropneumonia associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and diseases caused by pathogenic isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Based on the obtained R_0 values, recommendations for the veterinary services are made on preventive vaccination of pigs against the above mentioned diseases in the areas at risk of infection spread. The necessary conditions for wild boar depopulation aimed to prevent new African swine fever outbreaks are identified, namely, the elimination of at least 75% of the wild boar population living in the risk zone within the period of time equal to one infectious period.

Key words: infectious porcine diseases, basic reproduction number (R_0), vaccination, depopulation, wild boars.

Acknowledgements: The study has been performed within state budget financed research activities on the topic "Studies and assessment of contagious animal disease spread in the territory of the Russian Federation and preparation of forecasts and materials to compile dossiers and demonstrate disease freedom of the Subjects of the Russian Federation according to the requirements of the Terrestrial Animal Health Code in the OIE (FMD, CBPP, PPR, BSE)" (No. 081-00008-20-00 of December 19, 2019).

For citation: Gulenkin V. M., Korennoy F. I., Karaulov A. K. Basic reproduction number for certain infectious porcine diseases: estimation of required level of vaccination or depopulation of susceptible animals. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 179–185. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-179-185.

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

For correspondence: Vladimir M. Gulenkin, Candidate of Science (Biology), Head of Sector, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: gulenkin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Базовая скорость репродукции (R_0) – одна из основных количественных характеристик в эпидемиологии/эпизоотологии инфекционных заболеваний человека и животных. В популяционной биологии для системы «паразит – хозяин» понятие базовой скорости репродукции является центральным и выражается средним числом потомков, которых способен продуцировать один паразит, при этом количество потомков будет зависеть от биологических особенностей паразита [1].

Для инфекционных болезней животных R_0 – среднее количество вторично больных животных, которых способно «создать/воспроизвести» одно первично инфицированное животное, находясь в полностью восприимчивой популяции, за время, равное одному инфекционному периоду [1, 2].

То есть при введении одной инфицированной особи в некоторую ограниченную популяцию, в которой она имеет контакты с другими животными, до момента постановки диагноза с последующей изоляцией (обычно за время инфекционного периода) происходит заражение некоторого количества восприимчивых особей.

Данная величина непосредственно отражает как биологические свойства самого инфекционного агента, социально-экономические способы ведения животноводства, природные факторы обитания той популяции животных, в которую внедряется вирус (микроб), так и эффективность выбора методов борьбы с инфекцией, включая проведение профилактических мероприятий. Для внедрения и закрепления в популяции животных того или иного биологического агента должно выполняться соотношение $R_0 > 1$. В равновесии каждая инфицированная особь в однородно перемешанной популя-

ции восприимчивых животных порождает только одну вторично инфицированную особь, которая затем выздоравливает или погибает, т. е. в этом случае $R_0 = 1$. При $R_0 < 1$ происходит затухание эпидемического процесса.

В эпизоотологии взаимодействие между популяцией паразитов (биоагентами) и их хозяевами (животными) с прямым механизмом передачи инфекции выражают в виде простой феноменологической модели типа «состояние – переход», или так называемой SIR-модели (см. рисунок). В этом случае в популяции выделяются несколько классов (состояний) животных: восприимчивые (S – susceptible), инфицированные (I – infectious) и иммунные (выздоровевшие) или удаленные (выведенные из стада) (R – recovered). То есть при внесении биоагента в популяцию восприимчивых животных и их последующем заражении они переходят в состояние инфицированных с дальнейшим приобретением постинфекционного иммунитета (выздоровления) или

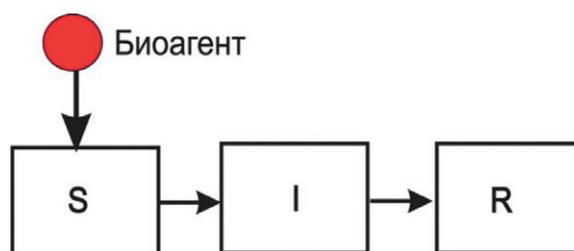


Рис. Простая феноменологическая модель эпизоотического процесса типа SIR

Fig. A simple phenomenological model (SIR model) of the epidemic process

удалением из популяции (смерть, вынужденный убой животных) – состояние (R).

На основании теории модели типа «состояние – переход», разработанной А. Г. McKendrick и W. О. Kermak в 1927–1933 гг., руководителем математического отдела Всемирной организации здравоохранения Н. Бейли была предложена математическая модель эпидемического процесса, которая представляет систему дифференциальных уравнений [1]. Теория математической модели эпизоотий начинается с рассмотрения однородно перемешанного стада, состоящего из популяции животных численностью в N особей. Пусть в начальный момент времени t в этом стаде находится S – восприимчивых к той или иной болезни животных, I – больных животных (источников инфекции) и R – удаленных, т. е. $S + I + R = N$. Было сделано предположение, что среднее число новых случаев болезни (ΔI) среди восприимчивых животных (S) на каком-то интервале времени (Δt) будет пропорционально как числу источников инфекции, так и количеству восприимчивых животных. Если частота контактов между животными в стаде будет постоянна и равна β , то среднее число новых случаев болезни животных за данный интервал наблюдений Δt будет равно $\beta SI \Delta t$, т. е. $\Delta S = -\beta SI \Delta t$.

Уравнение перехода $S - I - R$ можно выразить в виде системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{\partial S}{\partial t} &= -\beta SI \\ \frac{\partial I}{\partial t} &= \beta SI - \gamma I \\ \frac{\partial R}{\partial t} &= \gamma I\end{aligned}$$

при начальном условии $(S, I, R) = (S_0, I_0, 0)$ в момент времени $t = 0$.

В этой системе уравнений вводится параметр γ – частота случаев удаления зараженных животных, т. е. в интервале времени Δt из стада будет удалено $\gamma I \Delta t$ больных животных.

Классическое уравнение расчета величины R_0 из вышеприведенной системы уравнений будет определяться как:

$$R_0 = \beta/\gamma.$$

При значении $R_0 > 1$ инфекция получает дальнейшее распространение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В представленной работе использовались данные зарубежных и отечественных исследователей в области ветеринарии, которые провели оценку величины R_0 экспериментальным путем на восприимчивом поголовье животных при заражении их разными биоагентами с использованием модели динамики наблюдаемого перехода состояний животных типа SIR. Для оценки необходимого уровня вакцинации восприимчивого поголовья животных (P), гарантирующего предохранение от распространения особо опасных инфекционных заболеваний, использовали общепринятую формулу, имеющую вид [3]:

$$P = 1 - 1/R_0.$$

Эта же формула была применена для расчета необходимого уровня депопуляции диких кабанов в зоне риска распространения такого инфекционного заболевания, как африканская чума свиней (АЧС).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с увеличением количества случаев АЧС в некоторых странах Европы и Азии как среди популяции домашних свиней, так и среди диких кабанов ветеринарные специалисты проводят обширные научные исследования по изучению пространственно-временной динамики распространения данного инфекционного заболевания [4, 5]. Для количественной оценки динамики возможного распространения болезни среди животных на ферме в случае инфицирования хотя бы одного животного (замкнутая популяция), а также между фермами необходимо предвидеть количество и вероятность возможного появления новых вторичных очагов инфекции в зоне риска распространения АЧС. Это является одним из условий принятия строгого контроля передвижения/торговли животными и животноводческой продукцией на некотором расстоянии от первичного очага. Одним из возможных эпизоотологических параметров может быть оценочная величина R_0 , которая показывает, что в случае возникновения одной вспышки АЧС в зоне вероятного риска распространения инфекции за время, равное одному инфекционному периоду, могут появиться новые очаги. Особый интерес для эпизоотологии представляет вероятностное определение количественных данных потенциальной эпизоотии, т. е. сколько может возникнуть вторично заболевших животных в стаде в случае появления хотя бы одного больного животного (внутристадное R_0) или сколько может возникнуть вторичных очагов в зоне риска распространения инфекции (межстадное R_0) в зависимости от различных социальных, природных и экономических факторов. С этой целью были проанализированы доступные научные публикации на данную тему, результаты которых отражены в таблице 1.

Полученные результаты показывают, что в случае выявления хотя бы одного больного АЧС животного на ферме (внутри стада) величина последующего инфицирования восприимчивого поголовья может колебаться от 2 животных до 15 (для серотипа II), а инфекционный период может достигать до 14 сут, что, по всей видимости, связано со спецификой и структурой производства [6–9]. В работах российских исследователей [10] значение величины R_0 внутри популяции домашних свиней было определено в интервале от 4 до 11, а для распространения между фермами – от 2 до 3 (для серотипа II). С точки зрения развития эпизоотии это говорит о том, что в случае инфицирования вирусом АЧС одного животного на ферме в дальнейшем, по истечении одного инфекционного периода, в стаде ожидается заболевание по крайней мере еще 11 животных (в некоторых случаях до 47, как определено для серотипа I на острове Мальта) [11, 12]. При распространении вируса АЧС серотипа II в зоне риска из первичного очага (фермы) на другие фермы в течение инфекционного периода ожидается появление от 2 до 17 новых очагов [7, 10]. Для африканского вируса серотипа IX величина R_0 может составить порядка 3 [13].

По причине отсутствия эффективных вакцин для проведения вынужденной иммунизации животных одним из способов борьбы с распространением инфекции может быть только быстрый убой (в течение инкубационного периода) всего поголовья животных в зоне риска распространения инфекции при строгом соблюдении карантина и выполнении соответствующих ограничений [14]. Необходимое условие для

Таблица 1
Оценочные величины внутристадной и межстадной базовой скорости репродукции для АЧС по результатам проведенного анализа литературных источников

Table 1
The estimated values of within-herd and between-herd basic reproduction number for ASF based on the results of literature data analysis

Публикация	Генотип	Изолят	Продолжительность инфекционного периода (сут)	Межстадное R_0	Внутристадное R_0
С. А. Белянин и др. (2011)	II		6,8 (5,0–8,6)	–	–
H. C. De Carvalho Ferreira, et al. (2013)	I	Malta-78 Netherlands-86	6,8 ± 1,8 4,6 ± 1,4	–	18,0 (6,9–46,9)
J. Pietschmann, et al. (2015)	II	Armenia-08	2–9	–	6,1 (0,6–14,5) 5,0 (1,4–10,7)
C. Guinat, et al. (2015)	II	Georgia 2007/1	3–14	–	2,8 (1,3–4,8) внутри стойла 1,4 (0,6–2,4) между стойлами
V. M. Gulenkin, et al. (2011)	II	Russia	5–15	2–3	4–11
M. B. Barongo, et al. (2015)	IX	Uganda	–	3,24 (3,21–3,27) 1,63 (1,6–1,72) 1,9 (1,87–1,94)	–
F. I. Korennoy, et al. (2017)	I	Ukraine, 1977	7 (внутри фермы) 19 (между фермами)	1,65 (1,42–1,88)	7,46 (5,68–9,21)
C. Guinat, et al. (2018)	II	Russia	4,5–8,3	4,4–17,3	–
I. Iglesias, et al. (2016)	II	Russia	– (дикий кабан)	1,58 (1,13–3,77)	–
A. Marcon, et al. (2020)	II	Czech Republic Belgium	6 (дикий кабан)	1,95 1,65	–

предотвращения дальнейшего распространения инфекции из первичного очага в зоне риска (применительно к территории Российской Федерации) сводится к депопуляции не менее $P = 1 - 1/2 = 0,5$ (или 50%) восприимчивой популяции животных, находящейся в первой угрожаемой зоне [10].

Одной из мер, предпринимаемых для ликвидации АЧС среди диких кабанов, является их депопуляция (отстрел) в зоне риска распространения инфекции вокруг первичного очага заболевания (павшее от АЧС животное или получение положительного диагноза при диагностическом отстреле на территории обитания). С учетом полученных значений величины R_0 для популяции дикого кабана, максимальное значение которого может достигать 4 (3,77) [15, 16], необходимое и достаточное условие депопуляции (по верхнему доверительному интервалу) для дальнейшего предотвращения распространения заболевания будет определяться из соотношения $P = 1 - 1/4 = 0,75$ (или 75%). То есть при обнаружении в той или иной местности павшего от АЧС кабана необходимо немедленно (в течение инфекционного периода от 6 до 15 сут) уничтожить в зоне его обитания не менее 75% популяции. Обычно ареал обитания одной семьи может находиться в радиусе 2–5 км, однако, в зависимости от природно-ландшафтных условий местности, расстояние, преодолеваемое отдельными особями, может достигать 12–25 км за несколько дней [17]. Если, например,

в зоне риска находится популяция из 30 кабанов (около 3–4 семей), то после обнаружения хотя бы одного инфицированного животного необходимо быстро (по истечении одного инкубационного периода, по рекомендации МЭБ это 15 сут) уничтожить не менее 23 кабанов и провести соответствующие диагностические исследования. Только в этом случае могут быть выполнены необходимые и достаточные условия для предотвращения дальнейшего распространения АЧС в популяции дикого кабана.

В таблице 2 показаны количественные данные по величине R_0 для ряда заболеваний свиней. Данные получены зарубежными исследователями при постановке экспериментов по заражению восприимчивого поголовья полевым вирусом либо с помощью математического моделирования с использованием численных значений параметра трансмиссии (β), определенных при анализе развития естественных эпизоотий [18–21].

Как видно из представленных в таблице 2 данных, для такого инфекционного заболевания, как классическая чума свиней, наибольшее значение величины R_0 может быть порядка 81,3 (для порослят-отъемышей) [23, 24]. Это означает, что при проведении профилактической вакцинации в стаде необходимо обеспечить защитный иммунитет у 99% животных $[(1 - 1/81,3) \times 100\%]$, поэтому применяемые вакцины должны обладать высокой иммуногенностью.

Таблица 2

Внутристадная и межстадная оценочные величины базовой скорости репродукции для некоторых болезней свиней, полученные по результатам проведенного анализа данных литературы

Table 2

The estimated values of within-herd and between-herd basic reproduction number for certain porcine diseases based on the results of literature data analysis

Публикация	Болезнь (геном/штамм)	Продолжительность инфекционного периода (сут)	Межстадное R_0	Внутристадное R_0
A. Stegeman, et al. (1999)	классическая чума свиней	18	2,9	–
E. Weesendorp, et al. (2009)	классическая чума свиней шт. Paderborn шт. Brescia	–	–	36 17
D. Klinkenberg, et al. (2002)	классическая чума свиней	–	3,39 (между стойлами)	15,5 (внутри стойла)
H. Laevens, et al. (1999)	классическая чума свиней	32	–	13,7 81,3 (для поросят-отъемышей)
M. Andraud, et al. (2008)	цирковирус типа 2	35	1,47	5,9 (1,8–10,1)
M. Kluivers, et al. (2006)	энцефаломиокардит	–	–	1,4 (внутри стойла)
H. Maurice, et al. (2016)	энцефаломиокардит	–	–	4,2
H. Maurice, et al. (2002)	энцефаломиокардит	–	–	1,24 (0,39–4,35)
V. Spyrou, et al. (2004)	энцефаломиокардит	–	–	9,87 (комбинированная оценка по нескольким вирусам)
M. C. M. De Jong, T. G. Kimman (1994)	болезнь Ауески	–	–	10 (невакцинированные) 0,53 (вакцинированные)
P. L. Eble, et al. (2008)	ящур	2,3–6,5	–	40 (невакцинированные) 11 (вакцинированные однократно) 1 (вакцинированные четырехкратно)
A. G. J. Velthuis, et al. (2003)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	от 2 сут до нескольких недель (при хронической болезни)	10	–
T. Meyns, et al. (2004)	<i>Mycoplasma hyorhynchiae</i> (вирулентные изоляты)	позитивные после инокуляции 14–32	–	1,47 (0,68–5,38)
E. Pileri (2015)	репродуктивно-респираторный синдром свиней генотипа 1	12–14	невакцинированные 2,78 (2,13–3,43) вакцинированные 0,53 (0,19–0,76)	3,53 (2,89–4,18) ферма 1 7,11 (3,55–10,68) ферма 2
C. Charpin, et al. (2012) [22]	репродуктивно-респираторный синдром свиней генотипа 1	7–63	–	2,6 (1,8–3,3)
M. Bouwknegt, et al. (2008)	гепатит E	49 (блок 1) 13 (блок 2)	–	8,8 (4–19) (контактное заражение)

Для предотвращения распространения инфекции в зоне риска (между фермами) необходимо провести вынужденную вакцинацию (или депопуляцию) не менее чем 67% животных, входящих в эту зону $[(1 - 1/2,9) \times 100\%]$, при $R_0 = 2,9$ [20, 25].

Полученные P. L. Eble et al. данные по ящору говорят о том, что применяемые в исследовании вакцины при однократной иммунизации не обеспечили защиту свиней в замкнутой популяции животных (стаде) от распространения заболевания. Только при

четырёхкратной вакцинации заболевание может не получить дальнейшего распространения, но способно перейти в равновесное состояние (с гибелью или выздоровлением одного животного, при $R_0 = 1$) ввиду возможного образования не совсем устойчивого иммунитета у некоторых особей вакцинированной популяции животных [19]. Эти результаты указывают на то, что для иммунизации свиней должны быть созданы вакцины с высокой протективной активностью (иммуногенностью) и разработаны соответствующие схемы вакцинации, учитывающие возможность внедрения DIVA-стратегии.

Примененная в опубликованном М. С. М. De Jong и Т. Г. Kimman исследовании вакцина против болезни Ауески, обеспечивающая защиту не менее 90% животных в популяции, способна предотвратить дальнейшее распространение инфекции на ферме (стаде) при значении $R_0 = 10$ [18].

Для предотвращения распространения в стаде репродуктивно-респираторного синдрома свиней необходимо получить защитный иммунитет не менее чем у 91% вакцинированных животных $[(1 - 1/10,68) \times 100\%]$ при максимальном значении $R_0 = 10,68$ [18, 26]. Проведенные исследования показывают, что, если в зоне риска до возникновения вспышки была проведена надлежащая профилактическая вакцинация, заболевание не получит дальнейшего распространения между фермами, т. к. максимальное значение R_0 равно 0,76 [26]. При наличии восприимчивой популяции животных на фермах в зоне риска распространения инфекции необходимо создать защитный иммунитет не менее чем у 71% животных при максимальном значении $R_0 = 3,43$ $[(1 - 1/3,43) \times 100\%]$.

Для циркулирования типа 2, чтобы не допустить дальнейшего распространения инфекции, при максимальном значении $R_0 = 10,1$ при иммунизации необходимо получить защитный иммунитет у 90% животных [27]. Аналогичный результат установлен и для энцефаломиокардита (при $R_0 = 9,87$) [28–31].

При гепатите Е защитный иммунитет, получаемый в результате вакцинации (для максимального значения величины $R_0 = 19$, определенного в опытах при контактном заражении свиней), должен составлять порядка 95% [32].

Установлено, что для вирулентного изолята *Mycoplasma hyopneumoniae* [33] проведенная вакцинация на ферме должна защищать не менее 81% животных $[(1 - 1/5,38) \times 100\%]$ при верхнем доверительном интервале значения $R_0 = 5,38$. При данном уровне защиты популяции свиней, в случае заноса в нее инфекции, болезнь на ферме не должна возникнуть.

Данные, полученные для *Actinobacillus pleuropneumoniae* [21], указывают на тот факт, что, в случае появления хотя бы одного очага инфекции (ферма), животных в зоне риска дальнейшего распространения заболевания необходимо привить высокоактивными вакцинами. Охват поголовья должен составлять не менее 90% от общего количества ферм $[(1 - 1/10) \times 100\%]$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные значения базовой скорости репродукции R_0 для некоторых инфекционных заболеваний свиней показывают их определенную вариабельность. Это, по всей видимости, может зависеть от условий проведения лабораторных экспериментов,

выбора возрастной категории популяции животных для опыта, способов инфицирования, вирулентности используемого для заражения вируса и т. д. Тем не менее определение параметра R_0 вносит определенный научный вклад в основы прикладной эпизоотологии ряда инфекционных заболеваний свиней и необходимо при планировании противоэпизоотических мероприятий по проведению профилактической иммунизации или депопуляции восприимчивого поголовья животных для предотвращения возникновения вспышек заболевания и дальнейшего распространения инфекции. Так, для проведения депопуляции дикого кабана в зоне риска распространения АЧС необходимым условием прекращения дальнейшего распространения инфекции является уничтожение за время, равное одному инфекционному периоду, не менее 75% обитающей в угрожаемой зоне популяции животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

(п. п. 2–4, 7–13, 15–33 см. REFERENCES)

1. Бейли Н. Математика в биологии и медицине. М.: Мир; 1970. 326 с.
2. Африканская чума свиней в странах мира. ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ». 27.02.2020. Режим доступа: http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/foreign/2020/february/asf_world.pdf.
3. Белянин С. А., Васильев А. П., Колбасов Д. В., Цыбанов С. Ж., Балышев В. М., Куриннов В. В., Черных О. Ю. Вирулентность изолятов вируса АЧС. *Ветеринария Кубани*. 2011; 5: 9–10. eLIBRARY ID: 16911088.
4. 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: приказ МСХ РФ от 31.05.2016 № 213. Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71373924/>.

REFERENCES

1. Bailey N. T. J. The Mathematical Approach to Biology and Medicine. M.: Mir; 1970. 326 p. (in Russian)
2. Basic reproduction number. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Basic_reproduction_number.
3. Plotkin S. A., Orenstein W. A., Offin P. A. eds. Vaccines. 5th ed. Philadelphia: Saunders Company; 2008. 1725 p.
4. Guberti V., Khomenko S., Masiulis M., Kerba S. African swine fever in wild boar ecology and biosecurity. Rome. *FAO Animal Production and Health Manual*. 2019; No. 22. Rome: FAO, OIE and EC. Available at: <http://www.fao.org/3/ca5987en/CA5987EN.pdf>.
5. African swine fever in the countries of the world. Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH". 27.02.2020. Available at: http://fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/foreign/2020/february/asf_world.pdf. (in Russian)
6. Belyanin S. A., Vasilev A. P., Kolbasov D. V., Tsybanov S. Zh., Balyshchev V. M., Kurinnov V. V., Chernykh O. Yu. Virulence of African swine fever isolates. *Veterinaria Kubani*. 2011; 5: 9–10. eLIBRARY ID: 16911088. (in Russian)
7. Guinat C., Porphyre T., Gogin A., Dixon L., Pfeiffer D. U. Inferring within-herd transmission parameters for African swine fever virus using mortality data from outbreaks in the Russian Federation. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (2): e264–e271. DOI: 10.1111/tbed.12748.
8. Guinat C., Gubbins S., Vergne T., Gonzales J. L., Dixon L., Pfeiffer D. U. Experimental pig-to-pig transmission dynamics for African swine fever virus, Georgia 2007/1 strain. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144 (1): 25–34. DOI: 10.1017/S0950268815000862.
9. Pietschmann J., Guinat C., Beer M., Pronin V., Tauscher K., Petrov A., et al. Course and transmission characteristics of oral low-dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate. *Arch. Virol.* 2015; 160: 1657–1667. DOI: 10.1007/s00705-015-2430-2.
10. Gulenkin V. M., Korennoy F. I., Karaulov A. K., Dudnikov S. A. Cartographical analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio. *Prev. Vet. Med.* 2011; 102 (3): 167–174. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.07.004.
11. De Carvalho Ferreira H. C., Backer J. A., Weesendorp E., Klinkenberg D., Stegeman J. A., Loeffen W. L. A. Transmission rate of African swine fever virus under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* 2013; 165 (3–4): 296–304. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.03.026.

12. Korennoy F. I., Gulenkin V. M., Gogin A. E., Vergne T. Estimating the basic reproductive number for African swine fever using the Ukrainian historical epidemic of 1977. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64 (6): 1858–1866. DOI: 10.1111/tbed.12583.
13. Barongo M. B., Stahl K., Bett B., Bishop R. P., Fevre E. M., Aliro T., et al. Estimating the basic reproductive number (R_0) for African swine fever virus (ASFV) transmission between pig herds in Uganda. *PLoS One*. 2015; 10 (5):e0125842. DOI: 10.1371/journal.pone.0125842.
14. On approval of the veterinary rules for implementation of preventive, diagnostic, restrictive and other measures, the imposition and lifting of quarantine and other restrictions aimed to prevent the spread and eradicate the outbreaks of African swine fever [Об утверждении ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мер по предотвращению распространения и ликвидации очагов африканской чумы свиней]: Order of the RF Ministry of Agriculture No. 213 dated May 31, 2016. Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71373924/>. (in Russian)
15. Iglesias I., Munoz M., Montes F., Perez A., Gogin A., Kolbasov D., de la Torre A. Reproductive ratio for the local spread of African swine fever in wild boars in the Russian Federation. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63 (6): e237–e245. DOI: 10.1111/tbed.12337.
16. Marcon A., Linden A., Satran P., Gervasi V., Licoppe A., Guberti V. R_0 estimation for the African swine fever epidemics in wild boar of Czech Republic and Belgium. *Vet. Sci.* 2020; 7:2. DOI: 10.3390/vetsci7010002.
17. Garza S. J., Tabak M. A., Miller R. S., Farnsworth M. L., Burdett C. L. Abiotic and biotic influences on home-range size of wild pigs (*Sus scrofa*). *J. Mammal.* 2018; 99 (1): 97–107. DOI: 10.1093/jmammal/gyx154.
18. De Jong M. C. M., Kimman T. G. Experimental quantification of vaccine-induced reduction in virus transmission. *Vaccine*. 1994; 12 (8): 761–766. DOI: 10.1016/0264-410X(94)90229-1.
19. Eble P. L., De Koeijer A. A., De Jong M. C. M., Engel B., Dekker A. A meta-analysis quantifying transmission parameters of FMDV strain O Taiwan among non-vaccinated and vaccinated pigs. *Prev. Vet. Med.* 2008; 83 (1): 98–106. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2007.06.004.
20. Klinkenberg D., De Bree J., Laevens H., De Jong M. C. M. Within- and between-pen transmission of classical swine fever virus: a new method to estimate the basic reproduction ratio from transmission experiments. *Epidemiol. Infect.* 2002; 128 (2): 293–299. DOI: 10.1017/s0950268801006537.
21. Velthuis A. G. J., De Jong M. C. M., Kamp E. M., Stockhofe N., Verheijden J. H. M. Design and analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* transmission experiment. *Prev. Vet. Med.* 2003; 60 (1): 53–68. DOI: 10.1016/s0167-5877(03)00082-5.
22. Charpin C., Mahé S., Keranflec’h A., Belloc C., Cariolet R., Le Potier M.-F., Rose N. Infectiousness of pigs infected by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet. Res.* 2012; 43:69. DOI: 10.1186/1297-9716-43-69.
23. Laevens H., Koenen F., Deluyker H., De Kruijff A. Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus: Transmission of the virus, course of the disease and antibody response. *Vet. Rec.* 1999; 145 (9): 243–248. DOI: 10.1136/vr.145.9.243.
24. Weesendorp E., Backer J., Stegeman A., Loeffen W. Effect of strain and inoculation dose of classical swine fever virus on within-pen transmission. *Vet. Res.* 2009; 40:59. DOI: 10.1051/vetres/2009041.
25. Stegeman A., Elbers A. R. W., Bouma A., De Smit H., De Jong M. C. M. Transmission of classical swine fever virus within herds during the 1997–1998 epidemic in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 1999; 42 (3–4): 201–218. DOI: 10.1016/S0167-5877(99)00076-8.
26. Pileri E. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Assessment of the reproduction rate (R) in different conditions: PhD Thesis. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona, 2015. 130 p. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/a65c/8ebc1dfc3ff3402867816d5a35bcfdda0f2f.pdf>.
27. Andraud M., Glasland B., Durand B., Cariolet R., Jestin A., Madec F., et al. Modeling the time-dependent transmission rate for porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs using data from serial transmission experiments. *J. R. Soc. Interface.* 2008; 6 (30): 39–50. DOI: 10.1098/rsif.2008.0210.
28. Kluivers M., Maurice H., Vyt P., Koenen F., Nielen M. Transmission of encephalomyocarditis virus in pigs estimated from field data in Belgium by means of R_0 . *Vet. Res.* 2006; 37 (6): 757–766. DOI: 10.1051/vetres:2006035.
29. Maurice H., Nielen M., Stegeman J. A., Vanderhallen H., Koenen F. Transmission of encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified. *Vet. Microbiol.* 2002; 88: 301–314. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00127-X.
30. Maurice H., Thulke H. H., Schmid J. S., Stegeman A., Nielen M. Impact of compartmentalised housing on direct encephalomyocarditis virus (EMCV) transmission among pigs; insight from a model. *Prev. Vet. Med.* 2016; 127: 105–112. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.03.006.
31. Spyrou V., Maurice H., Billinis C., Papanastassopoulou M., Psalla D., Nielen M., et al. Transmission and pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats. *Vet. Res.* 2004; 35 (1): 113–122. DOI: 10.1051/vetres:2003044.
32. Bouwknecht M., Frankena K., Rutjes S. A., Wellenberg G. J., De Roda Husman A. M., Van der Poel W. H. M., De Jong M. C. M. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet. Res.* 2008; 39 (5):40. DOI: 10.1051/vetres:2008017.
33. Meyns T., Maes D., Dewulf J., Vicca J., Haesebrouck F., De Kruijff A. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiment. *Prev. Vet. Med.* 2004; 66 (1–4): 265–275. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2004.10.001.

Поступила 06.05.2020

Принята в печать 26.06.2020

Received on 06.05.2020

Approved for publication on 26.06.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гуленкин Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, заведующий сектором ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Коренной Федор Игоревич, кандидат географических наук, научный сотрудник ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Караулов Антон Константинович, кандидат ветеринарных наук, руководитель ИАЦ ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Vladimir M. Gulenkin, Candidate of Science (Biology), Head of Sector, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Fedor I. Korennoy, Candidate of Science (Geography), Researcher, 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.

Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2

П. Б. Акшалова¹, А. В. Андриясов², Л. О. Щербакова³, С. Н. Колосов⁴, Н. Г. Зиняков⁵, И. А. Чвала⁶, Д. Б. Андрейчук⁷

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

¹ ORCID 0000-0009-1520-1887, e-mail: akshalova@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-6314-2119, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-5434-6179, e-mail: scherbakova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-8467-180X, e-mail: kolosov@arriah.ru

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

⁶ ORCID 0000-0002-1659-3256 e-mail: chvala@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-1681-5795, e-mail: andreychuk@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время вирус гриппа птиц подтипа N2 активно циркулирует в популяциях домашних и диких птиц, и его регулярно выявляют в Китае, других странах Азии и России, особенно в комбинации с гемагглютинином подтипа H9. Поэтому применение метода для быстрого обнаружения данного инфекционного агента крайне необходимо. В представленной работе приводятся данные по выбору олигонуклеотидных праймеров и оптимизации условий постановки полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2. Для амплификации фрагмента гена нейраминидазы подтипа N2 были апробированы предложенные в 2016 году В. Нoffsman праймеры и зонды в модификации, а также выбранные в ходе исследования оригинальные праймеры и зонды с вирусами, имеющимися в рабочей коллекции лаборатории. В ходе работы определены оптимальные концентрации компонентов реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени и температурно-временной режим. Разные комбинации праймеров тестировали на десяти изолятах вируса гриппа птиц подтипа N2, генетически отличающихся друг от друга по гену N. Девять вирусов выделены от птиц из регионов Российской Федерации и относятся к различным генетическим группам. Специфичность метода проверяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени с использованием изолятов вируса гриппа птиц с другим подтипом нейраминидазы (H5N8, H3N6, H4N6, H5N1, H10N7), а также проб, содержащих РНК вирусов ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и инфекционной бурсальной болезни. В результате проведенных исследований были подобраны и оптимизированы условия постановки полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени, которые обеспечивают высокую чувствительность и специфичность метода.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, ОТ-ПЦР-РВ, оптимизация, подтип нейраминидазы N2, чувствительность, специфичность.

Благодарность: Работа выполнена за счет бюджетных средств в рамках выполнения государственного задания по теме «Разработка методов определения первичной структуры гена N подтипов N2 и N8 и гена N вируса гриппа птиц с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования».

Для цитирования: Акшалова П. Б., Андриясов А. В., Щербакова Л. О., Колосов С. Н., Зиняков Н. Г., Чвала И. А., Андрейчук Д. Б. Разработка метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 186–192. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-186-192.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Акшалова Перизат Батырханкызы, аспирант, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: akshalova@arriah.ru.

Development of real-time RT-PCR for N2 subtype avian influenza RNA-virus detection

P. B. Akshalova¹, A. V. Andriyasov², L. O. Scherbakova³, S. N. Kolosov⁴, N. G. Zinyakov⁵, I. A. Chvala⁶, D. B. Andreychuk⁷

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

¹ ORCID 0000-0009-1520-1887, e-mail: akshalova@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-6314-2119, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-5434-6179, e-mail: scherbakova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-8467-180X, e-mail: kolosov@arriah.ru

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

⁶ ORCID 0000-0002-1659-3256 e-mail: chvala@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-1681-5795, e-mail: andreychuk@arriah.ru

SUMMARY

Currently, N2 subtype avian influenza (AI) virus actively circulates in domestic and wild bird populations and is regularly detected in China, other Asian countries and Russia, particularly in combination with H9 hemagglutinin. Therefore, a method for rapid detection of the said infectious agent is urgently required. Data on oligonucleotide primer selection and reverse transcription real-time polymerase chain reaction condition optimization for N2 AI virus detection are presented in the paper. Modified primers and probe proposed by B. Hoffmann in 2006 as well as original primers and probes with the viruses available in the Laboratory working collection and selected during testing were assessed for N2 neuraminidase gene fragment amplification. Optimal concentrations of real-time RT-PCR master mix components and temperature-time mode were determined. Various combinations of primers were tested against ten N2 avian influenza virus isolates that genetically differed from each other in N gene. Nine viruses were isolated from birds in the Russian Federation regions and classified to different genetic groups. The real-time RT-PCR assay was tested for its specificity using AI virus isolates of different neuraminidase subtypes (H5N8, H3N6, H4N6, H5N1, H10N7) as well as samples containing other RNA-viruses: Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus and infectious bursal disease virus. As a result of the testing, real-time RT-PCR conditions providing high sensitivity and specificity of the assay were selected and optimized.

Key words: avian influenza virus, real-time RT-PCR, optimization, N2 neuraminidase subtype, sensitivity, specificity.

Acknowledgements: The works were financed by the budget in the framework of the official programme: "Development of the methods for determination of primary structure of N gene of N2 and N8 subtype and H gene of AIV with RT-PCR and nucleotide sequencing".

For citation: Akshalova P. B., Andriyasov A. V., Scherbakova L. O., Kolosov S. N., Zinyakov N. G., Chvala I. A., Andreychuk D. B. Development of real-time RT-PCR for N2 subtype avian influenza RNA-virus detection. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 186–192. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-186-192.

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

For correspondence: Perizat B. Akshalova, Post-Graduate Student, Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: akshalova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп птиц – острая инфекционная болезнь, вызываемая вирусом семейства *Orthomyxoviridae* с сегментированным РНК-геномом отрицательной полярности, относящимся к роду *Influenzavirus A* [1]. Благодаря сегментированному геному возможна реассортация вируса гриппа птиц.

Существующая классификация вирусов гриппа типа А основана на характеристике их антигенных свойств, определяемых поверхностными гликопротеинами: гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (НА).

На долю нейраминидазы приходится 20% от всех поверхностных гликопротеинов. На поверхности вириона можно наблюдать одиночный шип НА или локальные кластеры НА, окруженные НА [2]. Нейраминидаза выполняет важные функции при инфицировании вирусом гриппа: обеспечивает проникновение вирионов в эпителиальные клетки дыхательных путей; оптимизирует фузогенную активность НА; способствует высвобождению новых вирионов и предотвращает их агрегацию на поверхности клетки-хозяина.

На сегодняшний день от птиц выделены 16 подтипов НА и 9 подтипов НА в различных комбинациях. Однако в 2012 и 2013 гг. появились данные о двух новых подтипах НА и НА – Н17N10 и Н18N11, выделенных от летучих мышей [3, 4].

При проведении диагностических исследований в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» для выявления вируса гриппа птиц (ВГП) типа А в патологическом материале сначала используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с праймерной системой на ген М [5–7]. В случае получения положительного результата необходимо исключить наличие в пробе НА подтипов Н5 и Н7, поскольку ВГП данных подтипов могут быть высокопатогенными и под-

лежат уведомлению МЭБ. Для полноты характеристики вируса следует определить и подтип НА.

Одним из методов типирования НА является реакция торможения нейраминидазной активности (РНА) [8], однако ее постановка занимает не менее двух суток и требует набора высококачественных моноспецифических антисывороток и контрольных антигенов. Поскольку метод проводится с использованием высокотоксичных реагентов, необходимы особые условия для проведения реакции.

Следовательно, поиск новых высокочувствительных, специфичных и надежных способов обнаружения и идентификации подтипа НА крайне необходим для своевременной постановки диагноза, когда требуется в короткие сроки (в течение одного рабочего дня) определить нейраминидазу ВГП.

В настоящее время вирус гриппа с нейраминидазой подтипа N2 достаточно широко распространен и активно циркулирует в популяциях домашних и диких птиц. В 2018 г. ВГП подтипа H9N2 был выявлен в трех коммерческих хозяйствах Приморского края, а также на птицефабрике Республики Таджикистан. В 2017–2018 гг. вспышки высокопатогенного гриппа птиц H5N2 зарегистрированы на одной из птицефабрик Костромской области. В 2019 г. ВГП подтипа H9N2 выявляли в Челябинской области и Забайкальском крае [9, 10].

Таким образом, разработка метода выявления генома ВГП подтипа N2 на основе ОТ-ПЦР-РВ, характеризующейся высокой степенью чувствительности, специфичности, быстротой постановки и получения результата с целью повышения эффективности профилактических мероприятий, является актуальной.

Цель работы – разработка метода выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 на основе ОТ-ПЦР-РВ с оригинальной системой праймеров и зондов и оптимизация параметров реакции.

Таблица 1
Праймеры и зонды для амплификации фрагментов гена N ВГП подтипа N2 в ОТ-ПЦР-РВ

Table 1
Primers and probes used for real-time RT-PCR amplification of N2 AIV N gene fragments

№	Название праймеров	Последовательность 5'-3'	Количество оснований
1	AIVN2-1316f	GARACYAGAGTRTGGTGGAC	20
2	AIVN2-1319f	ACYAGAGTRTGGTGGACYTC	20
3	AIVN2-1325f	GTRTGGTGGACYCAAAYAG	20
4	AIVN2-1379-FAM	(FAM) GGAACAGGCTCATGGCCTGATGG (BHQ1)	22
5	AIVN2-1414 r	TTTTCTAAAATTGCGAAAGC	20
6	AIVN2-1421r	GGAGTTTTTTTTYAAAAATTG	20
7	AIVN2-1432r	AGTAGAAACAAGGAGTTTTT	20
8	AIVN2-1370-FAM	(FAM) GGTAЧHTATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGGRC (BHQ1)	34
9	AIVN2-1376-FAM	(FAM) TATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGG (BHQ1)	26
10	AIVN2-1367F	AGTCTGGTGGACYCAAAYAG	21
11	AIVN2-1488R	AATTGCGAAAGCTTATATAGVCAT	24
12	AIVN2-1444_FAM	(FAM) CCATCAGGCCATGAGCCT (RTQ1)	18
13	AIVN2-1418r	GCGAAAGCTTATATAGSCAT	20
14	AIVN2-1428r	TTTTCTAAAATTGCGARAGCTT	22
15	AIVN2-1430r	TTTTTTCTAAAATTGCGARAGC	22
16	AIVN2-1383FAM	(FAM)-CAGGCTCATGGCCTGATGG (RTQ1)	19
17	AIVN2R-1383FAM	(FAM) CCATCAGGCCATGAGCCTG (RTQ1)	19

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выбора праймеров и зондов, обеспечивающих высокий уровень чувствительности и специфичности ОТ-ПЦР-РВ, использовали изоляты ВГП подтипа N2 из рабочей коллекции референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ»: A/ty/Mass/65 H6N2, A/w.duck/Vladimir/446/09 H4N2, A/bird/Amursky/21/12 H9N2, A/chicken/Kostroma/3175/17 H5N2, A/chicken/Kostroma/2367/18 H5N2, A/chicken/Primorsk/419/18 H9N2, A/chicken/Tadjikistan/2379/18 H9N2, A/chicken/Primorsk/3124/18 H9N2, A/chicken/Chelyabinsk/30/19 H9N2, A/duck/Primorie/2621/2001 H5N2.

Оптимизация параметров ОТ-ПЦР-РВ проведена с использованием низковирулентного изолята ВГП A/chicken/Primorsk/419/18 подтипа H9N2, выделенного на территории Российской Федерации (Приморский край) в 2018 г. Оценку аналитической чувствительности ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием последовательных десятикратных разведений выделенной суммарной РНК изолятов A/ty/Mass/65 H6N2, A/bird/Amursky/21/12 H9N2, A/duck/Primorie/2621/2001 H5N2, A/chicken/Tadjikistan/2379/18 H9N2, A/chicken/Primorsk/3124/18 H9N2, A/chicken/Chelyabinsk/30/19 H9N2 в трех повторностях.

Для подбора праймеров использованы нуклеотидные последовательности гена N изолятов ВГП/N2, опубликованные с 1999 по 2018 г. в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/>).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма Clustal W и поиск наиболее консервативных участков проводили с помощью программы BioEdit 7.0. Специфичность праймеров и зондов была оценена с помощью online-ресурса Blast (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), с использованием изолятов ВГП других подтипов NA (A/w_duck/Altai/1732/2013 H3N6, A/shoveler/Krasnoyarsk/1586/08 H4N6, A/chicken/Adygea/203/06 H5N1, A/mallard/Khabarovsk/12/2014 H10N7), а также штаммов «Winterfield 2512» вируса инфекционной бурсальной болезни, «H120» вируса инфекционного бронхита кур и APMV/wild duck/Rus/Vladimir/44/15 вируса ньюкаслской болезни. Выбранные праймеры и зонды синтезированы фирмой «Синтол» (Россия) (табл. 1).

Все праймеры и зонды, за исключением № 10–12, подобраны в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ». Обратный праймер AIVN2-1418r и зонд (FAM) CCATCAGGCCATGAGCCTG (RTQ1) являются модификациями соответствующих олигонуклеотидов, указанных в публикации В. Hoffmann et al. Зонд и праймеры с № 10–12 также рекомендованы В. Hoffmann et al. [11].

Выделение РНК из аллантоисной жидкости развивающихся СПФ-эмбрионов кур, зараженных изолятами ВГП подтипа N2, проводили с использованием набора «АмплиПрайм РИБО-сорб» в соответствии с инструкцией по его применению. ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ) (Fermentas, кат. № R0181), термостабильной Taq-ДНК-полимеразы GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, кат. № M8295) и ревертазы MMLV (Синтол, кат. № E-040) в ампликаторе Rotor-Gene Q (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипа N2 включала в себя выбор системы праймеров и зонда, обеспечивающей достаточно высокую чувствительность и специфичность реакции. Также необходимо было определить оптимальные условия постановки реакции: концентрацию компонентов реакционной смеси и температурно-временной режим ОТ-ПЦР-РВ.

Выбор праймеров и зонда. С целью подбора праймерной системы для выявления нейраминидазы были проанализированы полные нуклеотидные последовательности гена NA изолятов ВГП подтипа N2, выделенных в период с 1999 по 2018 г. в странах Евразии и Африки и принадлежащих к различным генетическим группам, опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/>).

Для сравнительного анализа была сформирована первоначальная выборка из 2822 нуклеотидных последовательностей гена N изолятов ВГП/N2. После пошаговой оптимизации, удаления из выборки наиболее генетически схожих последовательностей для анализа было выбрано 169 наиболее отличающихся между собой. Для всех последовательностей характерно наличие относительно консервативных участков, расположенных в начале и конце гена. Наиболее оптимальной для посадки праймеров выбрана область из двухсот нуклеотидных оснований в конце гена N, поскольку

Таблица 2
Значения порогового цикла для изолятов ВГП в ОТ-ПЦР-РВ на ген М

Table 2
Ct-values for AIV isolates obtained by M gene-targeted real-time RT-PCR

№	Название изолятов	Исходный материал (Ct)	Значение Ct для разведения					
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1	A/bird/Amursky/21/12 H9N2	11,27	14,01	17,08	20,49	23,93	26,86	–
2	A/chicken/Primorsk/419/18 H9N2	11,22	14,98	18,67	22,38	28,46	30,59	36,20
3	A/chicken/Kostroma/2367/18 H5N2	12,47	15,80	19,72	23,48	28,58	30,66	35,31
4	A/w.duck/Vladimir/446/09 H4N2	14,04	18,08	22,07	26,27	30,22	34,35	–
5	A/chicken/Tadjikistan/2379/18 H9N2	12,62	16,49	20,21	23,77	27,14	–	–
6	A/chicken/Chelyabinsk/30/19 H9N2	11,09	15,30	19,06	22,29	26,26	32,21	–
7	A/chicken/Primorsk/3124/18 H9N2	11,08	13,85	17,45	20,86	23,71	27,41	30,45
8	A/duck/Primorie/2621/2001 H5N2	11,27	15,02	18,00	21,5	24,63	28,51	–
9	A/ty/Mass/65 H6N2	14,36	17,37	20,67	24,25	27,28	30,32	–

«–» – отрицательный результат реакции (negative result).

количество замен в этой области было наименьшим по сравнению с другими участками гена для всех последовательностей в выборке.

Одновременно с самостоятельным подбором праймеров анализировали описанные ранее результаты зарубежных авторов. Структуру праймеров, предложенных B. Hoffmann et al. [11] (№ 10–12, табл. 1), учитывали при выборе собственных праймеров.

В результате проведенной работы были выбраны и синтезированы 11 праймеров и 6 зондов для последующего их тестирования в ОТ-ПЦР-РВ с целью определения наиболее специфичной и чувствительной системы.

В ходе экспериментальных постановок ОТ-ПЦР-РВ с различными комбинациями праймеров и зондов с изолятами ВГП подтипа N2 была выбрана одна наиболее подходящая система праймеров (в таблице 1 выделены полужирным шрифтом), с которой проводилась последующая оптимизация реакции для повышения степени ее чувствительности. Дизайн обратного праймера и флуоресцентного зонда осуществлен в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» с минимальными изменениями нуклеотидной последовательности, указанными B. Hoffmann et al. Последовательность прямого праймера полностью соответствует представленной в данной публикации [11].

Оптимизация условий постановки ОТ-ПЦР-РВ.

В целях повышения чувствительности, специфичности и скорости ОТ-ПЦР-РВ для выявления генома вируса гриппа птиц подтипа N2 требовалось оптимизировать концентрацию компонентов реакционной смеси и температурно-временной режим реакции.

Непосредственно перед выполнением комплекса работ по оптимизации условий постановки ОТ-ПЦР-РВ на ген N протестированные десятикратные разведения (10⁻¹–10⁻⁶) выделенной суммарной РНК изолятов ВГП/N2 были проверены данным методом на ген M с системой праймеров и зонда, рекомендованных МЭБ [5–7]. Постановку реакции осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными

ми ранее в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [12]. Результаты, полученные в ОТ-ПЦР-РВ на ген M с изолятами ВГП подтипа N2 (табл. 2), были использованы для сопоставления с результатами оптимизированной реакции на ген N.

В целях повышения чувствительности и специфичности ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК ВГП подтипа N2 основной задачей была оптимизация концентрации компонентов реакционной смеси. Для достижения поставленной цели проведены постановки ОТ-ПЦР-РВ на ген N с использованием десятикратных разведений низковирулентного изолята ВГП подтипа H9N2, выделенного на территории Российской Федерации (Приморский край) в 2018 г. Для постановки реакции использовали тот же температурно-временной режим, что и в ОТ-ПЦР-РВ на ген M. В таблицах 3–6 представлены значения порогового цикла (Ct) реакции по двум разведениям РНК ВГП (10⁻³ и 10⁻⁴) в трех повторностях.

Подбор оптимальной концентрации хлорида магния в ОТ-ПЦР-РВ. Одним из необходимых компонентов реакционной смеси, без которого невозможно функционирование ДНК-полимеразы, являются ионы Mg²⁺. Они также оказывают наиболее существенное влияние на специфичность гибридизации праймеров. Оптимальная концентрация ионов Mg²⁺ может колебаться в достаточно широких пределах в зависимости от используемых систем праймеров и ферментов [13]. Для достижения наилучших результатов рекомендовано эмпирически подобрать концентрацию Mg²⁺ для используемой системы праймеров и ферментов. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Из представленных в таблице 3 данных следует, что изменение концентрации соли магния оказывает значительное влияние на процесс амплификации. Выход специфического ПЦР-продукта был обнаружен при добавлении в реакционную смесь 2 мкл MgCl₂. В ходе анализа полученных результатов было отмечено, что амплификация проходила эффективно при добавлении от 4 до 6 мкл раствора MgCl₂. При этом минимальное отклонение значения Ct были получены при использовании 5 мкл раствора хлорида магния. Это количество было принято за оптимальное. Следует

Таблица 3
Значения порогового цикла при подборе оптимальной концентрации $MgCl_2$ в ОТ-ПЦР-РВ

Table 3
Ct-values obtained by real-time RT-PCR during optimal $MgCl_2$ concentration selection

Разведение	Объем $MgCl_2$, мкл (концентрация 25 mM)							
	1,0	2,0	3,0	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
10^{-3}	—	28,19	27,19	22,74	23,74	23,63	24,13	22,88
10^{-3}	—	27,06	29,33	22,49	23,63	22,58	23,81	23,34
10^{-3}	—	28,14	28,57	22,25	24,08	23,89	23,99	23,22
Среднее	—	27,8	28,36	22,49	23,82	23,37	23,98	23,15
10^{-4}	—	32,97	31,16	27,03	28,96	27,85	27,55	27,07
10^{-4}	—	32,09	31,12	28,24	28,95	27,03	28,72	27,30
10^{-4}	—	33,16	33,53	28,12	29,76	27,59	29,45	27,34
Среднее	—	32,74	31,94	27,8	29,22	27,49	28,57	27,24

«—» — отрицательный результат реакции (negative result).

отметить, что увеличение концентрации солей магния может привести к уменьшению специфичности реакции.

Подбор оптимальной концентрации праймеров в ОТ-ПЦР-РВ. Оптимальную концентрацию праймеров AIVN2-1367F и AIVN2-1418r подбирали экспериментально. С представленными в таблице 4 разведениями готовили реакционные смеси, добавляя в каждую из них разный объем праймеров, начиная с 0,5 мкл и заканчивая 2 мкл. В таблице 4 указаны объемы каждого из праймеров: прямого и обратного.

В результате проведенных исследований было установлено, что увеличение концентрации праймеров приводит к уменьшению чувствительности реакции, что наглядно продемонстрировано в таблице 4. Наименьшие значения пороговых циклов получены в реакциях, где к смеси добавляли 0,5 мкл каждого из праймеров.

Подбор оптимальной концентрации флуоресцентного зонда. С целью повышения эффективности

амплификации и увеличения уровня флуоресценции амплификационных кривых был оптимизирован объем вносимого в реакцию зонда. Результаты исследований, полученные в ходе экспериментальной работы, сведены в таблицу 5. При добавлении в реакционную смесь от 0,75 и до 2 мкл зонда регистрировали незначительные изменения чувствительности ОТ-ПЦР-РВ. Средние пороговые значения отличались не более чем на 1,5 цикла. Наиболее стабильные результаты получены при использовании 1,5 мкл зонда AIVN2R-1383FAM. Кроме того, при добавлении указанного объема компонента на графике реакции визуально было заметно изменение максимальных значений уровня флуоресценции положительных проб.

С целью повышения чувствительности и специфичности ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК ВГП подтипа N2 были оптимизированы концентрации компонентов (хлорида магния, праймеров, флуоресцентного зонда) реакционной смеси. При использовании остальных

Таблица 4
Значения порогового цикла при подборе оптимальной концентрации праймеров в ОТ-ПЦР-РВ

Table 4
Ct-values obtained by real-time RT-PCR during optimal primer concentration selection

Разведение	Объем праймеров, мкл (концентрация 10 пмоль/мкл)			
	0,5	1	1,5	2
10^{-3}	21,03	22,13	22,61	23,34
10^{-3}	21,04	21,98	22,8	23,31
10^{-3}	21,13	22,4	22,09	23,23
Среднее	21,07	22,17	22,5	23,29
10^{-4}	25,08	26,96	27,44	30,16
10^{-4}	24,69	27,07	28,14	31,07
10^{-4}	24,82	26,58	28,41	28,95
Среднее	24,86	26,87	28	30,06

Таблица 5
Значения порогового цикла при подборе оптимальной концентрации флуоресцентного зонда в ОТ-ПЦР-РВ

Table 5
Ct-values obtained by real-time RT-PCR during optimal fluorescent probe concentration selection

Разведения	Объем зонда, мкл (концентрация 10 пмоль/мкл)				
	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0
10^{-3}	24,22	22,61	22,71	22,22	22,19
10^{-3}	24,55	23,47	22,65	21,97	22,56
10^{-3}	24,58	22,72	22,96	21,47	21,69
Среднее	24,45	22,93	22,77	21,89	22,15
10^{-4}	29,26	26,2	26,63	25,7	26,88
10^{-4}	28,05	27,61	27,62	25,62	26,32
10^{-4}	27,47	25,91	27,4	25,84	25,98
Среднее	28,26	26,57	27,22	25,72	26,39

компонентов реакции придерживались рекомендаций производителей.

Оптимизация температурно-временных параметров ОТ-ПЦР-РВ. Следующим этапом работы являлась оптимизация температурно-временного режима, собственно ПЦР, поскольку температурный режим обратной транскрипции определяется используемым ферментом – обратной транскриптазой. В данном случае речь идет об определении оптимальной температуры отжига для праймерной системы, состоящей из подобранных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченного зонда. Остальные этапы ПЦР – денатурация и синтез ДНК – проходят в достаточно узком температурном диапазоне. Денатурацию обычно проводят при 90–95 °С, а элонгацию цепи ДНК – при 68–72 °С [13]. Результаты подбора температуры отжига праймеров при постановке ОТ-ПЦР-РВ представлены в таблице 6.

Согласно представленным в таблице 6 данным, сопоставимые значения пороговых циклов наблюдаются при установке температурного диапазона отжига праймеров в пределах 55–60 °С. В целом данный диапазон температур подходит для большинства праймерных систем, используемых в ОТ-ПЦР-РВ для молекулярной диагностики гриппа птиц. Представляется вполне логичным использование этой же температуры отжига для идентификации подтипа N2. Таким образом, осуществить постановку ОТ-ПЦР-РВ на различные гены (М, Н, N) возможно в ходе одного запуска амплификатора и тем самым быстрее получить результат и поставить диагноз.

В оптимизированном варианте для постановки ОТ-ПЦР-РВ устанавливали следующие температурно-временные параметры: 20 мин при 40 °С (обратная транскрипция), 10 мин при 95 °С (активация полимераза), далее 40 циклов ПЦР, состоящие из денатурации ДНК в течение 10 сек при 95 °С, отжига праймеров – 35 сек при 55 °С и элонгации кДНК – 10 сек при 72 °С.

Сравнительная чувствительность и специфичность метода ОТ-ПЦР-РВ для выявления генома ВГП подтипа N2. Одним из важнейших показателей ОТ-ПЦР-РВ является чувствительность. Обычно речь идет об аналитической чувствительности, то есть о минимальном количестве возбудителя, которое обнаруживается данным методом в конкретном клиническом материале. В данной работе речь ведется о сравнительной чувствительности, поскольку было проведе-

Таблица 6
Значения порогового цикла при подборе оптимальной температуры отжига праймеров и зонда

Table 6
Ct-values obtained during optimal primer and probe annealing temperature selection

Разведения	Температура отжига, °С		
	60	55	50
10 ⁻³	22,04	22,22	21,91
10 ⁻³	21,77	21,97	22,82
10 ⁻³	21,79	21,47	22,47
Среднее значение	21,87	21,89	22,4
10 ⁻⁴	25,12	25,70	27,2
10 ⁻⁴	25,39	26,62	27,06
10 ⁻⁴	25,86	25,84	26,58
Среднее значение	25,46	26,05	26,95

но сравнение по этому параметру двух ОТ-ПЦР-РВ для выявления гена М (данные представлены в таблице 2) и гена N (табл. 7). Для оценки чувствительности разработанного метода были приготовлены последовательные десятикратные разведения выделенной суммарной РНК 6 изолятов ВГП. С целью получения более достоверных данных ОТ-ПЦР-РВ ставили в трех повторностях.

В результате оптимизации концентрации компонентов и температурно-временных параметров реакции на ген N значения порогового цикла (Ct) десятикратных разведений изолятов ВГП были сопоставимы со значениями Ct для гена М. Количество разведений с положительным результатом для каждого изолята ВГП было одинаково в сравниваемых ОТ-ПЦР-РВ.

Оценку специфичности метода проводили, используя пробы с генетическим материалом ВГП подтипов N2 и N1, N6, N7, N8, а также пробы, содержащие РНК вирусов ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни. В ходе экспериментальной работы были получены отрицательные результаты со всеми неспецифическими патогенами, подтверждающие специфичность разработанной ОТ-ПЦР-РВ.

Таблица 7
Значения порогового цикла для изолятов ВГП в ОТ-ПЦР-РВ на ген N

Table 7
Ct-values for AIV isolates obtained by N gene-targeted real-time RT-PCR

Название изолятов	Исходный материал (Ct)	Значение Ct для разведения					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
A/chicken/Tadjikistan/ 2379/18 H9N2	12,19	15,92	19,24	23,16	26,11	–	–
A/chicken/Chelyabinsk/30/19 H9N2	10,30	13,88	17,53	20,75	25,91	29,82	–
A/chicken/Primorsky/ 3124/18 H9N2	10,62	13,43	17,22	21,05	24,77	29,10	36,73
A/bird/Amursky/21/12 H9N2	10	13,57	17,22	21,11	25,54	30,04	–
A/duck/Primorie/2621/2001 H5N2	11,3	14,52	18,31	21,72	25,14	29,25	–
A/ty/Mass/65 H6N2	10,9	14,34	18,54	21,24	26,04	29,70	–

«–» – отрицательный результат реакции (negative result).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была подобрана праймерная система для выявления генома вируса гриппа птиц подтипа N2 и оптимизированы условия постановки ОТ-ПЦР-РВ: компонентный состав реакционной смеси и температурно-временной режим реакции. Показано, что с помощью предложенного метода возможно выявлять РНК вируса гриппа птиц указанного подтипа в пробах биологического материала. Высокие специфичность и чувствительность метода ОТ-ПЦР-РВ были подтверждены успешным выявлением генетического материала ВГП/N2 в пробах от птиц, поступивших для исследования в 2019–2020 гг. из нескольких регионов Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ
(п. п. 1, 3–8, 11 см. REFERENCES)

- Штыря Ю. А., Мочалова Л. В., Бовин Н. В. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция. *Acta Naturae*. 2009; 1 (2): 28–34. eLIBRARY ID: 15119687.
- Волкова М. А., Чвала Ир. А., Ярославцева П. С., Сосипаторова В. Ю., Осипова О. С., Чвала И. А. Серологический мониторинг гриппа птиц в Российской Федерации в 2017–2018 годах. *Ветеринария сегодня*. 2019; 2 (29): 3–7. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-3-7.
- Зиняков Н. Г., Осипова О. С., Акшалова П. Б., Сосипаторова В. Ю., Андриясов А. В., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Анализ генетических свойств изолята вируса гриппа A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, выделенного на территории Челябинской области. *Ветеринария сегодня*. 2019; 4 (31): 49–53. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-49-53.
- Андриясов А. В., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц типа А методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 31.05.2016 № 45-16. Владимир: 2016. 13 с.
- Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю., Семенов П. А., Савилова А. М., Кofiadi И. А., Абрамов Д. Д. ПЦР в реальном времени. Под ред. Д. В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2009. 223 с.

REFERENCES

- Alexander D. J. Orthomyxovirus infections. In: *Virus Infections of Birds*. Vol. 3. Ed. by J. B. McFerran, M. S. McNulty. Amsterdam: Elsevier; 1993; 287–316.
- Shtyrya Y. A., Mochalova L. V., Bovin N. V. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae*. 2009; 1 (2): 28–34. eLIBRARY ID: 15119687. (in Russian)

3. Tong S., Li Y., Rivaller P., Conrardy Ch., Castillo D. A., Chen L.-M., et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109 (11): 4269–4274. DOI: 10.1073/pnas.1116200109.

4. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (10): e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657.

5. Spackman E., Senne D. A., Myers T. J., Bulaga L. L., Garber L. P., Perdue M. L., et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40 (9): 3256–3260. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002.

6. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th ed. Paris, 2018. Chap. 3.03.04. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf.

7. Suarez D. L., Das A., Ellis E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis*. 2007; 51 (1 Suppl): 201–208. DOI: 10.1637/7732-101006-REGR.1.

8. Pedersen J. C. Neuraminidase-inhibition assay for the identification of influenza A virus neuraminidase subtype or neuraminidase antibody specificity. *Methods Mol. Biol*. 2008; 436: 67–75. DOI: 10.1007/978-1-59745-279-3_9.

9. Volkova M. A., Chvala I. A., Yaroslavtseva P. S., Sosipatorova V. Yu., Osipova O. S., Chvala I. A. Serological monitoring for avian influenza in the Russian Federation in 2017–2018. *Veterinary Science Today*. 2019; 2 (29): 8–11. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-3-7.

10. Zinyakov N. G., Osipova O. S., Akshalova P. B., Sosipatorova V. Yu., Andriyasov A. V., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Analysis of genetic characteristics of influenza virus A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolated in Chelyabinsk oblast. *Veterinary Science Today*. 2019; 4 (31): 49–53. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-49-53.

11. Hoffmann B., Hoffmann D., Henritzi D., Beer M., Harder T. C. Riems influenza a typing array (RITA): An RT-qPCR based low-density array for subtyping avian and mammalian influenza a viruses. *Sci. Rep*. 2016; 6:27211. DOI: 10.1038/srep27211.

12. Andriyasov A. V., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Methodical Guidelines for detection of avian influenza A virus RNA with real-time RT-PCR [Metodicheskie rekomendacii po vyvavleniyu RNK virusa grippa ptic tipa A metodom OT-PCR v rezhime real'nogo vremeni]: approved by the FGBI "ARRIAH" on May 31, 2016, No. 45-16. Vladimir: 2016. 13 p. (in Russian)

13. Rebrikov D. V., Samatov G. A., Trofimov D. Yu., Semenov P. A., Savilova A. M., Kofiadi I. A., Abramov D. D. Real-time PCR. Ed. by D. V. Rebrikov. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy. 2009. 223 p. (in Russian)

Поступила 04.06.2020

Принята в печать 07.08.2020

Received on 04.06.2020

Approved for publication on 07.08.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Акшалова Перизат Батырханкызы, аспирант, сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андриясов Артем Валерьевич, кандидат биологических наук, ведущий 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.

Зиняков Николай Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР и мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Perizat B. Akshalova, Post-Graduate Student, Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Artem V. Andriyasov, Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), 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.

Nikolay G. Zinyakov, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research and Monitoring, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-193-198
УДК 619:616.98:616.36-002:636.8

Микробиоценоз желчи у кошек при остром холангиогепатите

А. А. Руденко¹, Д. С. Усенко², А. Ф. Руденко³

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» (ФГБОУ ВО «МГУПП»), г. Москва, Россия

^{2,3} ГОУ ЛНР «Луганский национальный аграрный университет» (ГОУ ЛНР ЛНАУ), г. Луганск, Луганская Народная Республика

¹ ORCID 0000-0002-6434-3497, e-mail: vetrudek@yandex.ru

² ORCID 0000-0002-3757-9998, e-mail: den-usenko@yandex.ru

³ ORCID 0000-0002-3211-1800, e-mail: vetrudek@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Условно-патогенные микроорганизмы являются возбудителями множества заболеваний у животных, в том числе внутренних болезней (гастроэнтерит, пневмония, нефрит, гепатит, холецистит и т. д.). Холангиогепатит – одна из самых распространенных патологий печени у кошек, которая может приводить к летальному исходу. Объектом исследования была желчь кошек, больных острым холангиогепатитом, полученная прижизненно под контролем ультрасонографии. Объем желчи, отобранной у кошек с помощью чрескожной пункции желчного пузыря, составил $2,6 \pm 0,85$ см³. Осложнений после проведения холецистоцентеза у животных не отмечали. Изучен микробиоценоз желчи у 51 кошки. Основной причиной острого нейтрофильного холангиогепатита у кошек являются условно-патогенные бактерии. Спектр бактериальных патогенов представлен изолятами *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*. В инфекционном процессе принимали участие двухкомпонентные ассоциации в 75% случаев, а трехкомпонентные – в 25% случаев. Из поликомпонентных бактериальных ассоциаций у больных кошек чаще всего встречались *E. faecalis* + *E. coli* (26,9%), реже – *E. aerogenes* + *E. coli* (15,4%), *P. vulgaris* + *E. coli* (11,5%), *S. aureus* + *E. coli* (11,5%), редко – *P. aeruginosa* + *E. coli* (7,7%), *S. aureus* + *E. cloacae* (3,9%), *S. aureus* + *E. faecalis* (3,9%), *P. mirabilis* + *E. coli* (3,9%), *S. epidermidis* + *E. coli* (3,9%), *E. coli* + *S. epidermidis* + *E. faecalis* (3,9%), *P. aeruginosa* + *E. coli* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. faecalis* + *E. coli* + *C. freundii* (3,9%). Доминирующим компонентом указанных ассоциаций является *E. coli* сероваров O101 (28,9%), O41 (20,0%), O141 (15,6%), O26 (13,3%), O138 (13,3%), O15 (6,7%) и O33 (2,2%). Установлено, что 76,25% изолятов условно-патогенных микроорганизмов, изолированных из желчи больных холангиогепатитом кошек, были патогенными для белых мышей.

Ключевые слова: холангиогепатит, кошки, микробиоценоз, желчь, бактобилия.

Благодарность: Авторы выражают признательность академику РАН, доктору ветеринарных наук, профессору Борису Вениаминовичу Уша за консультативную помощь.

Для цитирования: Руденко А. А., Усенко Д. С., Руденко А. Ф. Микробиоценоз желчи у кошек при остром холангиогепатите. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 193–198. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-193-198.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Руденко Андрей Анатольевич, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «МГУПП», 125080, Россия, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11, e-mail: vetrudek@yandex.ru.

UDC 619:616.98:616.36-002:636.8

Bile microbiocenosis in cats suffering from acute cholangiohepatitis

A. A. Rudenko¹, D. S. Usenko², A. F. Rudenko³

¹ FSBEI HE "Moscow State University of Food Production" (FSBEI HE "MSUFP"), Moscow, Russia

^{2,3} SEI LPR "Lugansk National Agrarian University" (SEI LNR LNAU), Lugansk, Lugansk People's Republic

¹ ORCID 0000-0002-6434-3497, e-mail: vetrudek@yandex.ru

² ORCID 0000-0002-3757-9998, e-mail: den-usenko@yandex.ru

³ ORCID 0000-0002-3211-1800, e-mail: vetrudek@mail.ru

SUMMARY

Commensal microorganisms are responsible for numerous diseases of animals, including diseases of internal organs (gastroenteritis, pneumonia, nephritis, hepatitis, cholecystitis, etc.). Cholangiohepatitis, one of the most common liver diseases in cats, is often fatal. The focus of the study was the bile of cats, suffering from acute cholangiohepatitis. The bile was sampled using non-lethal method guided by USG. The bile amount, taken from cats by percutaneous puncture of the gall bladder, was 2.6 ± 0.85 cm³. No complications following the cholecystocentesis were observed in the animals. The microbiocenosis of bile from 51 cats was studied. Acute feline neutrophilic cholangiohepatitis is mostly caused by commensal bacteria. The range of bacterial pathogens includes the isolates of *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*. The infectious process was caused by two-component associations in 75% of cases, and by three-component associations in 25%. Most common polycomponent bacterial associations included *E. faecalis* + *E. coli* (26.9%), less common – *E. aerogenes* + *E. coli* (15.4%), *P. vulgaris* + *E. coli* (11.5%), *S. aureus* + *E. coli* (11.5%), rarely – *P. aeruginosa* + *E. coli* (7.7%), *S. aureus* + *E. cloacae* (3.9%), *S. aureus* + *E. faecalis* (3.9%), *P. mirabilis* + *E. coli* (3.9%), *S. epidermidis* + *E. coli* (3.9%), *E. coli* + *S. epidermidis* + *E. faecalis* (3.9%), *P. aeruginosa* + *E. coli* + *S. epidermidis* (3.9%), *E. faecalis* + *E. coli* + *C. freundii* (3.9%). The predominant component of the mentioned associations is *E. coli* serovars O101 (28.9%), O41 (2.0%), O141 (15.6%), O26 (13.3%), O138 (13.3%), O15 (6.7%) and O33 (2.2%). It was established that 76.25% of commensal microorganism isolates, recovered from the bile of cats, suffering from feline cholangiohepatitis, were pathogenic for white mice.

Key words: cholangiohepatitis, cats, microbiocenosis, bile, bactobilia.

Acknowledgments: The authors wish to thank Professor Boris V. Usha, Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Veterinary Sciences, for advisory assistance.

For citation: Rudenko A. A., Usenko D. S., Rudenko A. F. Bile microbiocenosis in cats suffering from acute cholangiohepatitis. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 193–198. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-193-198.

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

For correspondence: Andrey A. Rudenko, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), Professor of the Chair for Veterinary Medicine, FSBEI HE “MSUPP”, 125080, Russia, Moscow, Volokolamskoe shosse, 11, e-mail: vetrudek@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Условно-патогенные микроорганизмы являются возбудителями множества заболеваний животных, в том числе внутренних болезней (гастроэнтерит, пневмония, нефрит, гепатит, холецистит и т. д.) [1]. Холангиогепатит является одной из самых распространенных патологий печени у кошек и часто приводит к летальному исходу [2, 3]. Данная нозология характеризуется развитием бактериального или иммуноопосредованного воспалительного процесса в паренхиме печени и желчных протоках, вторичными метаболическими изменениями, интоксикацией и дегидратацией организма [2, 4]. Согласно данным по распространенности гепатобилиарной патологии у кошек, острый (бактериальный, нейтрофильный) холангиогепатит занимает второе место после печеночного липидоза [2, 3, 5].

Основной причиной острого нейтрофильного холангиогепатита у кошек являются условно-патогенные бактерии: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp. [5]. В механизмах формирования и прогрессирования холангиогепатита у кошек важное значение играет нарушение оттока желчи, так как в физиологических условиях непрерывный ее поток, а также совместная иммунологическая защита эпителиоцитов желчевыводящих путей сохраняют гепатобилиарный тракт стерильным [6]. Нарушение оттока и застой желчи создают благоприятные условия к ретроградному попаданию бактериальных патогенов из просвета тонкого кишечника [3, 5, 7]. Исходя из вышесказанного, дискинезия желчных протоков на фоне частичной обструкции и последующей восходящей билиарной инфекции являются ключевым фактором в развитии острого бактериального холангиогепатита у кошек. Острый воспалительный процесс, отек и утолщение стенок желчных протоков в свою очередь также усугубляют застойные явления и формируют патологический круг взаимовлияния [8, 9]. Значимый рост давления желчи в протоковой системе печени приводит к снижению защитных иммунологических механизмов,

что обеспечивает благоприятные условия для роста и развития условно-патогенных микроорганизмов. В дальнейшем воспалительный процесс охватывает окружающую желчные протоки паренхиму печени, возникает бактериальная транслокация в системный кровоток, что приводит к развитию бактериемии [10, 11].

В клинической практике при воспалительных заболеваниях гепатобилиарного тракта у кошек в последнее время широко используется прижизненная оценка стерильности тканей печени и желчи [12]. Для исследований можно отбирать как желчь, так и паренхиму печени, а саму процедуру осуществляют под контролем ультрасонографии [13]. Вместе с тем бактериологическое исследование желчи является более информативным, чем исследование пунктатов паренхимы печени [5]. F. Schiborra et al. провели анализ результатов, полученных при изучении бактериальной микрофлоры желчи у мелких домашних животных и ее цитологическом исследовании [12]. Бактериальные культуры из желчи изолированы с частотой 21,3%. Чаще всего из желчи выделяли *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., реже – *Clostridium perfringens*, *Bacteroides* spp. и *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Listeria* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Streptococcus bovis* и *Pseudomonas*. Микробные ассоциации в желчи собак и кошек выделяли с частотой 43,8%. В результате цитологических исследований бактобилия была установлена у 17,3% кошек. Образцы печени, полученные у больных кошек хирургическим путем или лапароскопией, с большей вероятностью давали чистые культуры, чем образцы, полученные путем чрескожной тонкоигльной биопсии [5].

Таким образом, изучение бактериальных ассоциаций в желчи у кошек при остром холангиогепатите является актуальным направлением ветеринарной медицины мелких домашних животных.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы является качественное и количественное изучение микробиоценозов желчи у кошек, больных острым холангиогепатитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в период с 2015 по 2019 г. на кафедре заразных болезней, патанатомии и судебной ветеринарии ГОУ ЛНР «Луганского национального аграрного университета» (г. Луганск, Луганская Народная Республика). Клинические исследования проводили на базе частных ветеринарных клиник г. Донецка.

Объектом исследования была желчь кошек, больных острым холангиогепатитом, полученная прижизненно под контролем ультразвукографии. Группы формировали по мере поступления больных животных в клинику. Кошек подбирали в исследование согласно критериям включения и исключения.

Критерии включения: клинические, лабораторные и ультразвукографические признаки острого холангиогепатита у кошек.

Критерии исключения: гепатолипидоз, гепатодистрофия, острый гепатит, асептические (иммуноопосредованные) формы холангита, онкологический процесс в брюшной полости, положительные результаты паразитологического исследования кала, позитивный результат ПЦР-теста на наличие возбудителей инфекционного перитонита, вирусного иммунодефицита, вирусной лейкемии кошек и гемотропных микоплазм.

Диагноз при остром холангиогепатите кошек ставили комплексно с учетом анамнестических данных, клинического осмотра, физикального обследования, морфологического и биохимического анализов крови, ультразвукографии [9].

Холецистоцентез у больных холангиогепатитом кошек проводили под кратковременной мультимодальной анестезией. Использовали премедикацию габапентином перорально в дозе 50 мг/кг, через 15 мин внутримышечно вводили раствор дексмететомидина гидрохлорида (5–10 мкг/кг), еще через 20 мин внутривенно вводили пропופол в дозе 1–2 мг/кг.

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости было выполнено с использованием мультимодального микроконвексного датчика с частотой 6–9 МГц. Оптимальную точку для пункции желчного пузыря определяли ультразвукографически. Прокол брюшной стенки осуществляли справа. В асептических условиях под контролем ультразвука проводили холецистоцентез с использованием шприца (5 см³) и иглы 22G (0,7 × 40 мм). Использовали чреспеченочную методику доступа. Аспирировали в шприц максимально возможный объем желчи. Операционное поле в области прокола трехкратно обрабатывали 70%-м этанолом. В конце процедуры проводили контрольное ультразвукографическое исследование гепатобилиарной системы у подопытных кошек для оценки потенциального повреждения желчного пузыря.

Бактериологическое исследование желчи больных холангиогепатитом кошек заключалось в посеве ее на ряд питательных сред (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, глюкозо-сывороточный бульон и агар Сабуро). После инкубации в термостате при температуре 38 °С или при комнатных условиях (агар Сабуро) в течение 24–72 ч из колоний разного типа делали пересев на чашки Петри со средами Эндо, мясо-пептонный агар, кровяной мясо-пептонный агар. Пробирки, в которых отсутствовал рост микроорганизмов, дополнительно выдерживали в термостате при температуре 38 °С в течение 10 сут. После изучения культурально-морфологических свойств отдельные типичные колонии

микроорганизмов высевали на мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный полужидкий агар и инкубировали при 38 °С в течение 24 ч. Далее изучали тинкториальные свойства культур бактерий по общепринятым методикам. Подвижность микробов определяли по характеру роста бактерий в мясо-пептонном полужидком агаре.

Все чистые культуры бактерий высевали на среды Гисса с глюкозой, мальтозой, маннозой, сахарозой, лактозой, дульцитом и маннитом. Каталазную активность определяли у всех бактериальных изолятов. Для этого бакмассу, снятую петлей с агаровой поверхности, суспендировали на предметном стекле в одной капле 3%-й перекиси водорода.

Грамположительные кокки проверяли на гемолитическую и коагулазную активность, а также проводили тесты на способность роста при 45 и 10 °С, pH 9,6, при добавлении 40% желчи крупного рогатого скота и 6,5% хлорида натрия. Для дифференциации стафилококков от микрококков использовали тест окисления/ферментации глюкозы в среде Хью-Лейфсона.

У грамотрицательных палочковидных бактерий дополнительно изучали ферментацию таких углеводов, как сорбит и инозит; лизиндекарбоксилазную, орнитиндекарбоксилазную, β-галактозидазную и фенилаланиндезаминазную активность; способность синтезировать ацетилметилкарбинол, сероводород и индол; утилизировать малонат и цитрат натрия.

Для устранения подвижности у культур протей перед проведением исследований в бактериологические чашки с мясо-пептонным агаром добавляли 96%-й этанол с экспозицией в течение 3–5 мин и последующим удалением. Для идентификации и дифференциации псевдомонад исследуемые культуры пересеивали на среду Кинга в пробирки с мясо-пептонным бульоном и выдерживали в термостате при 42 °С в течение 24–48 ч.

Дальнейшую идентификацию и дифференциацию выделенных культур микроорганизмов осуществляли с использованием общепринятых методик исследований в соответствии с «Определителем бактерий Берджи»¹. Определение серогрупп эшерихий проводили с помощью набора агглютинирующих O-количесывороток.

Патогенные свойства бактерий изучали путем постановки биологической пробы на белых мышах. Для этого каждым изолятом в дозе 0,5 см³ суточной бульонной культуры внутрибрюшинно заражали трех белых мышей массой 14–16 г. Культуры считали патогенными в случае гибели одной или более мышей в течение 5 сут после заражения.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014, принятым Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

На заключительном этапе бактериологического исследования обращали внимание на видовой состав

¹ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1–5. ed. G. M. Garrity. 2nd ed. NY: Springer-Verlag; 2001–2012.

и соотношению различных видов бактерий-возбудителей острого холангиогепатита у кошек.

Полученные цифровые данные подвергали математической обработке на персональном компьютере

с использованием лицензированных программ MS Excel и Statistica 7.0².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объем желчи, отобранной у кошек с помощью чрескожной пункции желчного пузыря, составил $2,6 \pm 0,85$ мл. Осложнений после проведения холецистоцентеза у животных не отмечали. С целью изучения этиологической роли бактериальных микробиоценозов в развитии острого холангиогепатита проведены бактериологические исследования. Из желчи 51 больной кошки было изолировано 80 культур условно-патогенных бактерий (табл. 1).

Из изолированных культур микроорганизмов 59 были грамотрицательными, а 21 – грамположительными. Чаще всего изолировали *E. coli* (45), реже – *E. faecalis* (13), редко – *S. aureus* (5), *E. aerogenes* (4), *P. aeruginosa* (4), *P. vulgaris* (3), *S. epidermidis* (3), *E. cloacae* (1), *P. mirabilis* (1) и *C. freundii* (1). Полученные в ходе работы данные соответствуют результатам других исследований, опубликованных ранее [5, 12].

Особенно важными для практической ветеринарии оказались результаты анализа частоты выделения монокультур и ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов из желчи кошек, больных острым холангиогепатитом.

В ходе исследования установлено, что из желчи больных кошек 55 культур условно-патогенных микроорганизмов выделено в составе ассоциаций и 25 – монокультур (табл. 2).

В составе ассоциаций часто изолировали *E. coli* (43,6%), реже – *E. faecalis* (18,2%), редко – *S. aureus* (9,1%), *E. aerogenes* (7,2%), *P. vulgaris* (5,5%), *P. aeruginosa* (5,5%), *S. epidermidis* (5,5%), *C. freundii* (1,8%), *E. cloacae* (1,8%) и *P. mirabilis* (1,8%). В монокультуре часто выделяли *E. coli* (84,0%), редко – *E. faecalis* (12,0%) и *P. aeruginosa* (4,0%). Следует добавить, что в качестве монокультуры из желчи больных острым холангиогепатитом кошек не изолировали *C. freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus* и *S. epidermidis*.

В качественном отношении выявлено 12 вариантов бактериальных ассоциаций (табл. 3). При определении количественного и качественного состава микробиоценозов у кошек, больных острым холангиогепатитом, обнаружено 26 ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов (по 2–3 сочлена).

Частота выделения двухкомпонентных ассоциаций из желчи больных острым холангиогепатитом кошек составила 75,0%, трехкомпонентных – 25,0%. Из поликомпонентных ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов чаще всего встречались *E. coli* + *E. faecalis* (26,9%), реже – *E. coli* + *E. aerogenes* (15,4%), *E. coli* + *P. vulgaris* (11,5%), *E. coli* + *S. aureus* (11,5%), редко – *E. coli* + *P. aeruginosa* (7,7%), *E. cloacae* + *S. aureus* (3,9%), *E. faecalis* + *S. aureus* (3,9%), *E. coli* + *P. mirabilis* (3,9%), *E. coli* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. coli* + *E. faecalis* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. coli* + *P. aeruginosa* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. coli* + *E. faecalis* + *C. freundii* (3,9%). Следует отметить, что данные относительно количественного и качественного состава микробиоценоза желчи кошек, больных острым холангиогепатитом, получены нами впервые.

² Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера; 2002. 312 с.

Таблица 1

Видовой состав бактерий, вызывающих развитие острого бактериального холангиогепатита у кошек

Table 1

Species composition of bacteria, responsible for acute feline bacterial cholangiohepatitis

Вид микроорганизма	Количество изолятов	
	абсолютное число	%
Грамотрицательные		
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	5,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1,2
<i>Escherichia coli</i>	45	56,3
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,2
<i>Proteus vulgaris</i>	3	3,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	5,0
Грамположительные		
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	6,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	16,3
Всего	80	100,0

Таблица 2

Частота изоляции монокультур и ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов из желчи кошек, больных острым холангиогепатитом

Table 2

Isolation frequency of opportunistic microflora monocultures and associations from the bile of cats, suffering from acute cholangiohepatitis

Название микроорганизма	Выделено изолятов, в частности:			
	в виде ассоциаций		в чистой культуре	
	количество	%	количество	%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,8	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	7,2	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1,8	0	0
<i>Escherichia coli</i>	24	43,6	21	84,0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,8	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	5,5	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	5,5	1	4,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	9,1	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	5,5	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	18,2	3	12,0
Всего	55	100,0	25	100,0

Необходимо подчеркнуть, что в большинстве случаев обязательным компонентом этих ассоциаций являются эшерихии.

Наиболее часто из желчи больных острым холангиогепатитом кошек изолировали эшерихии серовара O101 (28,9%), реже – O41 (20,0%) и O141 (15,6%), редко – O138 (13,3%), O26 (13,3%), O15 (6,7%) и O33 (2,2%) (табл. 4).

Патогенные свойства 80 культур условно-патогенных бактерий, изолированных из желчи больных острым холангиогепатитом кошек, представлены в таблице 5.

Установлено, что из 80 изолятов условно-патогенных бактерий, выделенных из желчи кошек, больных холангиогепатитом, 61 был патогенным для белых мышей, 19 культур оказались апатогенными (76,25 и 23,75% соответственно). Следует отметить, что все изоляты *P. aeruginosa* и *C. freundii* были патогенными для белых мышей.

Также следует добавить, что 39 из 45 изолятов *E. coli* (86,7%) были патогенными для белых мышей, а культуры *S. epidermidis*, *E. cloacae* и *P. mirabilis* – апатогенными. Полученные данные косвенно подтверждают гипотезу о том, что при определенных условиях возникает трансформация апатогенных штаммов микроорганизмов в патогенные. Перспективным направлением для дальнейших исследований считаем изучение биологических свойств условно-патогенных бактерий у кошек, больных острым бактериальным холангиогепатитом, а также разработку высокоэффективных способов терапии данной патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробиоценоз желчи у кошек, больных острым холангиогепатитом, представлен изолятами *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. epidermidis*, *E. cloacae*, *P. mirabilis* и *C. freundii*. Частота встречаемости двухкомпонентных ассоциаций составляла 75,0%, трехкомпонентных – 25,0%. Из билиарных бактериальных ассоциаций у больных кошек преобладали *E. coli* + *E. faecalis* (26,9%), реже выявляли *E. coli* + *E. aerogenes* (15,4%), *E. coli* + *P. vulgaris* (11,5%), *E. coli* + *S. aureus* (11,5%), редко – *E. coli* + *P. aeruginosa* (7,7%), *E. cloacae* + *S. aureus* (3,9%), *E. faecalis* + *S. aureus* (3,9%), *E. coli* + *P. mirabilis* (3,9%), *E. coli* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. coli* + *E. faecalis* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. coli* + *P. aeruginosa* + *S. epidermidis* (3,9%), *E. coli* + *E. faecalis* + *C. freundii* (3,9%). В большинстве случаев обязательным компонентом этих ассоциаций являлись *E. coli* сероваров O101 (28,9%), O41 (20,0%), O141 (15,6%), O138 (13,3%), O26 (13,3%), O15 (6,7%) и O33 (2,2%). Установлено, что 80,0% изолятов условно-патогенных бактерий, выделенных из желчи кошек, больных холангиогепатитом, были патогенными для белых мышей. При этом все изоляты *P. aeruginosa* и *C. freundii*, а также большинство изолятов *E. coli* (86,7%) обладали патогенными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 5–13 см. REFERENCES)

1. Марченко Э. В., Руденко А. А. Микробиоценозы у собак, больных парвовирусным энтеритом. *Ученые записки УО ВГАВМ*. 2014; 50 (2-1): 44–47. Режим доступа: <http://repo.vsavm.by/handle/123456789/2469>.
2. Морозенко Д. В. Патогенетична роль порушень метаболізму сполучної тканини, інформативність його показників для діагностики та оцінки ефективності лікування собак і котів за внутрішніх хвороб: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Біла Церква; 2014. 44 с.

3. Усенко Д. С., Руденко А. А. Морфологические показатели крови у кошек при холангиогепатите. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2019; 6: 6–15. DOI: 10.26155/vet.zoo.bio.201906001.

4. Сысуева А. В. Морфофункциональные изменения эритроцитов при патологиях печени у мелких домашних животных: автореф. дис. ... канд. вет. наук. М.; 2009. 23 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003472069#?page=1>.

Таблица 3
Структура ассоциаций бактерий, вызывающих острый холангиогепатит у кошек

Table 3
Structure of bacterial associations, responsible for acute feline cholangiohepatitis

Количество микробов-ассоциантов	Количество ассоциаций	Видовой состав ассоциаций бактерий
2	7	<i>E. coli</i> + <i>E. faecalis</i>
	4	<i>E. coli</i> + <i>E. aerogenes</i>
	3	<i>E. coli</i> + <i>P. vulgaris</i>
	3	<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>
	1	<i>E. cloacae</i> + <i>S. aureus</i>
	1	<i>E. faecalis</i> + <i>S. aureus</i>
	1	<i>E. coli</i> + <i>P. mirabilis</i>
	1	<i>E. coli</i> + <i>S. epidermidis</i>
	2	<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>
	3	1
1		<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. epidermidis</i>
1		<i>E. coli</i> + <i>E. faecalis</i> + <i>C. freundii</i>

Таблица 4
Серологическая типизация изолятов *E. coli*, изолированных из желчи кошек, больных острым бактериальным холангиогепатитом

Table 4
Serological typification of *E. coli* isolates, recovered from the bile of cats, suffering from acute cholangiohepatitis

Серогруппы	Количество выделенных культур	
	абсолютное число	%
O15	3	6,7
O26	6	13,3
O33	1	2,2
O41	9	20,0
O101	13	28,9
O138	6	13,3
O141	7	15,6
Всего	45	100,0

Таблица 5
Патогенность для белых мышей изолятов бактерий, выделенных от кошек при остром бактериальном холангио гепатите

Table 5
Pathogenicity of bacterial isolates, recovered from cats suffering from acute cholangiohepatitis for white mice

Вид микроорганизма	Исследовано культур	Патогенные		Непатогенные	
		количество изолятов	%	количество изолятов	%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	1,6	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	3	4,9	1	5,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	1	5,3
<i>Escherichia coli</i>	45	39	63,9	6	31,4
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	1	5,3
<i>Proteus vulgaris</i>	3	2	3,3	1	5,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	4	6,6	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	3,3	3	15,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	0	0	3	15,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	10	16,4	3	15,8
Всего	80	61	100,0	19	100,0

REFERENCES

- Marchenko E. V., Rudenko A. A. Microbiocenoses in dogs with parvovirus enteritis [Mikrobocenozy u sobak, bol'nyh parvovirusnym enteritom]. *Scientific Notes of the Educational Institution "Vitebsk Order of the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine* 2014; 50 (2-1): 44–47. Available at: <http://repo.vsavm.by/handle/123456789/2469>. (in Russian)
- Morozenko D. V. Pathogenetic role of the connective tissue metabolic disturbances, informativity of its showings for the diagnostics and estimation of the effectiveness of dogs and cats internal organs treatment [Patogenetichna rol' porushen' metabolizmu spoluchnoi tkanini, informa-

tivnist' jogo pokaznikiv dlya diagnostiki ta ocinki effektivnosti likuvannya sobak i kotiv za vnutrishnih hvorob]: Author's abstract. thesis ... Doctor of Sciences (Vet. Med.). Bila Tserkva. 2014 44 p. (in Ukrainian)

3. Usenko D. S., Rudenko A. A. Morphological blood parameters in cats with cholangiohepatitis. *Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya*. 2019; 6: 6–15. DOI: 10.26155/vet.zoo.bio.201906001. (in Russian)

4. Sysueva A. V. Morphofunctional changes of erythrocytes in liver pathologies in small domestic animals [Morfofunkcional'nye izmeneniya eritrocitov pri patologiyah pecheni u melkih domashnih zhivotnyh]: Author's abstract. thesis ... Cand. of Sciences (Vet. Med.). M.; 2009. 23 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003472069#?page=1>. (in Russian)

5. Wagner K. A., Hartmann F. A., Trepanier L. A. Bacterial culture results from liver, gallbladder, or bile in 248 dogs and cats evaluated for hepatobiliary disease: 1998–2003. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; 21 (3): 417–424. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb02984.x.

6. Ma H.-D., Zhao Z.-B., Ma W.-T., Liu Q.-Z., Gao C.-Y., Li L., et al. Gut microbiota translocation promotes autoimmune cholangitis. *J. Autoimmun.* 2018; 95: 47–57. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.09.010.

7. Twedt D. C., Cullen J., McCord K., Janeczko S., Dudak J., Simpson K. Evaluation of fluorescence in situ hybridization for the detection of bacteria in feline inflammatory liver disease. *J. Feline Med. Surg.* 2014; 16 (2): 109–117. DOI: 10.1177/1098612X13498249.

8. Griffin S. Feline abdominal ultrasonography: what's normal? what's abnormal? The liver. *J. Feline Med. Surg.* 2019; 21 (1): 12–24. DOI: 10.1177/1098612X18818666.

9. Boland L., Beatty J. Feline cholangitis. *Vet. Clin. Nort. Am. Small Anim. Pract.* 2017; 47 (3): 703–724. DOI: 10.1016/j.cvs.2016.11.015.

10. Oguz S., Salt O., Ibis A. C., Gurcan S., Albayrak D., Yalta T., et al. Combined effectiveness of honey and immunonutrition on bacterial translocation secondary to obstructive jaundice in rats: experimental study. *Med. Sci. Monit.* 2018; 24: 3374–3381. DOI: 10.12659/MSM.907977.

11. Tzounos C. E., Tivers M. S., Adamantos S. E., English K., Rees A. L., Lipscomb V. J. Haematology and coagulation profiles in cats with congenital portosystemic shunts. *J. Feline Med. Surg.* 2017; 19 (12): 1290–1296. DOI: 10.1177/1098612X17693490.

12. Schiborra F., McConnell J. F., Maddox T. W. Percutaneous ultrasound-guided cholecystocentesis: complications and association of ultrasonographic findings with bile culture results. *J. Small Anim. Pract.* 2017; 58 (7): 389–394. DOI: 10.1111/jsap.12697.

13. Köster L., Shell L., Illanes O., Lathroum C., Neuville K., Ketzis J. Percutaneous ultrasound-guided cholecystocentesis and bile analysis for the detection of *Platynosomum* spp.-induced cholangitis in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2016; 30 (3): 787–793. DOI: 10.1111/jvim.13943.

Поступила 19.03.2020

Принята в печать 15.04.2020

Received on 19.03.2020

Approved for publication on 15.04.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Руденко Андрей Анатольевич, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «МГУПП», Москва, Россия.

Усенко Денис Сергеевич, аспирант кафедры заразных болезней, патологической анатомии и судебной ветеринарии, ГОУ ЛНР «Луганский национальный аграрный университет», Луганск, Луганская Народная Республика.

Руденко Анатолий Федорович, кандидат ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой заразных болезней, патологической анатомии и судебной ветеринарии ГОУ ЛНР «Луганский национальный аграрный университет», Луганск, Луганская Народная Республика.

Andrey A. Rudenko, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, Department of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia.

Denis S. Usenko, Post-Graduate Student, Department of Contagious Diseases, Pathological Anatomy and Forensic Veterinary Medicine, GOU LNR Luhansk National Agrarian University, Luhansk, Luhansk People's Republic.

Anatoliy F. Rudenko, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Professor, Head of the Department of Contagious Diseases, Pathological Anatomy and Forensic Veterinary Medicine, GOU LNR Luhansk National Agrarian University, Luhansk, Luhansk People's Republic.

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-199-204
 УДК 619:616-099-02:636.086:636.8:635.84

Отравление кота ложными сморчками

Erdem Gülersoy¹, Tuğçe Manolya Baş², Mahmut Ok³

Университет Сельчук, г. Конья, Турция

¹ ORCID 0000-0001-8511-0150, e-mail: egulersoy@selcuk.edu.tr

² ORCID 0000-0002-7118-0235, e-mail: tugcebass00@gmail.com

³ ORCID 0000-0002-8210-6735, e-mail: mok@selcuk.edu.tr

РЕЗЮМЕ

Данный случай произошел с котом породы шиншилла весом 3,5 кг, который был доставлен в лечебницу факультета ветеринарной медицины Университета Сельчук с жалобами на отказ от корма, вялость, нарушение координации, водянистую диарею и сильную рвоту. На основании анамнеза подозревалося отравление грибами. В результате осмотра и лабораторного тестирования было диагностировано отравление ложными сморчками (строчками), впоследствии диагноз подтвердили, обнаружив споры данных ядовитых грибов при флотационном исследовании фекалий. Для лечения вводили внутривенно 40 мл/кг 0,9%-го изотонического раствора хлорида натрия (Polyplex, Polifarma®); в качестве противорвотного и для уменьшения висцеральной боли – подкожно 1 мг/кг маропитанта (Cerenia, Zoetis®); внутривенно 140 мг/кг N-ацетилцистеина (Nacosel, Haver Farma®), а также витамины и аминокислоты (Diphalyte, Zoetis®). Для поддержания функции печени в течение 21 сут, согласно назначению, вводили перорально S-аденозин-L-метионин (SAMe) и силибин (Denamarin, Nutramax®). При повторном обследовании было установлено, что кот полностью выздоровел. Был сделан вывод о том, что отравление ложными сморчками (строчками) наряду с основными нарушениями работы желудочно-кишечного тракта может вызывать поражения печени и неврологические расстройства. Для диагностики очень важен анамнез и выявление проглоченных спор сморчков при флотационном исследовании фекалий, прогноз течения болезни обусловлен степенью поражения печени.

Ключевые слова: кот, ложные сморчки, строчки *Gyromitra*, отравление, интоксикация.

Для цитирования: Gülersoy Erdem, Baş Tuğçe Manolya, Ok Mahmut. Отравление кота ложными сморчками. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 199–204. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-199-204.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Gülersoy Erdem, доктор ветеринарной терапии, факультет ветеринарной медицины, Университет Сельчук, 42250, Турция, г. Конья, e-mail: egulersoy@selcuk.edu.tr.

UDC 619:616-099-02:636.086:636.8:635.84

False morel poisoning in a cat

Erdem Gülersoy¹, Tuğçe Manolya Baş², Mahmut Ok³

Selcuk University, Konya, Turkey

¹ ORCID 0000-0001-8511-0150, e-mail: egulersoy@selcuk.edu.tr

² ORCID 0000-0002-7118-0235, e-mail: tugcebass00@gmail.com

³ ORCID 0000-0002-8210-6735, e-mail: mok@selcuk.edu.tr

SUMMARY

The material of this case consisted of a 3,5 kg male Chinchilla cat which brought to Selcuk University Veterinary Faculty Animal Hospital with the complaints of anorexia, stagnation, incoordination, watery diarrhea and severe vomiting. Mushroom intoxications suspected according to the anamnesis. False morel poisoning was diagnosed as a result of physical examination and laboratory test and it was confirmed by presence of ingested spore of morel in fecal flotation examination. As a treatment, 0.9% isotonic NaCl (Polyplex, Polifarma®) solutions 40 ml/kg via IV, maropitant (Cerenia, Zoetis®) 1 mg/kg as an antiemetic and to reduce visceral pain via SC, N-acetylcysteine (Nacosel, Haver Farma®) 140 mg/kg via IV, vitamins and amino acid supplementation (Diphalyte, Zoetis®) via IV are administered. For liver health supplementation SAMe and silybin (Denamarin, Nutramax®) 15 mg/kg via PO for 21 days prescribed. On re-examination, the cat was fully recovered. It was concluded that false morel poisoning may cause liver damage, neurologic findings along with the primary gastrointestinal system disorders. Anamnesis, presence of the ingested spore of morel observed during fecal examination is very important in the diagnosis and the prognosis is affected by the magnitude of liver damage.

Key words: cat, false morel, *Gyromitra*, poisoning, intoxication.

For citation: Gülersoy Erdem, Baş Tuğçe Manolya, Ok Mahmut. False morel poisoning in a cat. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 199–204. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-199-204.

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

For correspondence: Erdem Gülersoy, Doctor of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Selcuk University, 42250, Turkey, Konya, e-mail: egulersoy@selcuk.edu.tr.

ВВЕДЕНИЕ

Как для людей, так и для животных грибы бывают съедобные и ядовитые. Ядовитость гриба зависит от вида содержащегося в нем токсина и потребленной дозы. Повсеместно распространенные гепатотоксичные грибы, такие как *Amanita ocreata* и *Amanita phalloides* (мухоморы и бледные поганки), содержат в основном циклопептиды (аматоксины), вызывающие острые поражения печени как у людей, так и у животных. Грибы, содержащие гидразины (например, *Gyromitra* spp., также известные как ложные сморчки или строчки), псилоцин и псилоцибин (например, *Psilocybe* spp., *Panaeolus* spp., *Conocybe* spp. и *Gymnopilus* spp.) и изоксазолы (например, *Amanita pantherine*, *Amanita muscaria*), считаются нейротоксичными. Гастроэнтеротоксичные грибы, такие как *Agaricus* sp. и *Boletus* sp., содержат токсины, которые в основном вызывают признаки поражения желудочно-кишечного тракта [1]. Известно, что многие виды съедобных и несъедобных грибов вызывают отравления у кошек. Однако точных данных о ядовитых для кошек видах и токсичных дозах нет [2].

Моршелловые грибы (грибы *Morchella* sp.), которые являются настоящими сморчками, относятся к съедобным сумчатым грибам из порядка пецицевых (*Pezizales*). Эти грибы по виду напоминают медовые соты из-за сети выпуклых ребер, образующих их шляпку [3]. Как и моршелловые грибы, ложные сморчки (строчки) также являются представителями порядка *Pezizales*. В Турции, Китае, Северной Америке, Индии и Пакистане эти грибы находят в изобилии. В Турции, особенно Бейшехире (Конья), сбор моршелловых грибов является важной статьей экономики и туристической отрасли [4].

Gyromitra esculenta – строчок обыкновенный, известный в Европе под названием «ложный сморчок». Шляпка гриба 5–9 см в высоту и 10 см в диаметре, цвет варьирует от красно-коричневого до темно-коричневого. Ножка полая 2–3 см в длину, 1–3 см в диаметре. У представителей семейства моршелловых шляпка представляет собой ячейки, разграниченные перегородками, тогда как у грибов *Gyromitra esculenta* она имеет борозды, напоминающие извилины мозга. Употребление в пищу строчков, не прошедших термической обработки, вызывает тяжелое отравление с возможностью летального исхода [5]. Ложные сморчки раньше считались съедобными, однако в настоящее время их все чаще относят к разряду ядовитых. В строчках, особенно сырых, содержатся гиромитрины – токсины, оказывающие разрушительное воздействие на центральную нервную систему, печень и желудочно-кишечный тракт. Гиромитрины полностью не экстрагируются даже при длительном вываривании. Поэтому нередки случаи отравлений и даже смерти после употребления ложных сморчков. Тяжесть отравления зависит от количества съеденных грибов и времени, прошедшего после их употребления. В легких случаях наблюдаются симптомы гастроэнтерита, в тяжелых – возможен летальный исход. Уровень смертности среди людей со-

ставляет около 10% [6, 7]. Токсическим метаболитом гиромитрина является монометилгидразин (ММН), который связывает и ингибирует пиридоксаль фосфокиназу, таким образом подавляя активацию витамина В6 (пиридоксаль-5'-фосфат) и препятствуя его участию в качестве кофактора в синтезе гамма-аминомасляной кислоты (GABA). Гидразины, подобно ММН, также могут образовывать гидразоны и гидразиды, что может приводить к дальнейшему поражению органов. Гидразоны индуцируют перекисное окисление липидов в печени, таким образом вызывая тяжелые поражения этого органа [8]. Первые признаки появляются начиная с 5–12 ч вплоть до 53 ч после потребления [9]. В большинстве случаев тяжелые поражения печени наблюдаются в течение следующих 2 сут, также возможны тяжелые поражения почек. Цитолитический гепатит иногда сопровождается гемолизом. При тяжелых формах интоксикации могут появляться неврологические нарушения, такие как нервозность, делирий, кома и конвульсии, как следствие действия ММН [8, 9].

Симптомы, выявляемые при осмотре, часто неспецифичны и могут включать угнетение, обезвоживание, тремор мышц, сухость слизистых, вздутие живота, спутанность сознания. Может наблюдаться рвота и водянистая диарея [10]. Желтушность – поздний симптом, типичный для более тяжелых случаев, проявляющийся через 3 сут после употребления. При потреблении больших количеств ядовитых грибов могут наблюдаться признаки нарушения работы центральной нервной системы, включая нервозность, нарушение координации движений и конвульсии [7].

Лечение должно быть симптоматическим. Необходимо проводить мониторинг динамики кровообращения, концентрации ионов в крови, азотемии, креатинемии и газов крови для компенсации гидроэлектrolитических потерь. Тяжелое поражение печени и гемолиз можно диагностировать посредством проведения раннего биохимического анализа сыворотки крови по биологическим показателям: повышение уровня аспартатаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT), билирубина, триглицеридов и лактатдегидрогеназы (LDH) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Случай отравления произошел у кота породы шиншилла весом 3,5 кг, животное было доставлено в ветеринарную лечебницу факультета ветеринарной медицины Университета Сельчук с жалобами на отказ от корма, вялость, нарушение координации, водянистую диарею и сильную рвоту. В ходе сбора анамнеза выяснилось, что обычно кот питается консервированным кормом, иногда выходит за пределы дома. Владелец не был свидетелем того, как кот ел строчки, однако известно, что в том районе, где он живет (Бейшехир, Конья), эти грибы растут в изобилии. После примерно 8-часового отсутствия кот вернулся домой вялым, хозяин обратил внимание на повышенное слюноотделение.



Рис. 1. Изображение спор сморчков и остатков растений при исследовании под световым микроскопом (увеличение $\times 40$, неокрашенные)

Fig. 1. Image of the spores of morel and plant debris in light microscope ($\times 40$ magnification, unstained)

При осмотре животного наблюдали гиперсаливацию, слабость, вздутие живота, угнетенное состояние. Для постановки диагноза были проведены анализ газового состава крови, общий клинический анализ крови, биохимический анализ, флотационное исследование кала, ультразвуковая эхография брюшной полости и рентгенографическое исследование. При флотационном исследовании фекалий были выявлены остатки растений и споры строчков, яиц и цист паразитов обнаружено не было (рис. 1).

В ходе рентгенографического исследования брюшной полости было обнаружено утолщение слизистой оболочки желудка и вздутие живота (рис. 2).

В ходе ультразвуковой эхографии брюшной полости было подтверждено наличие утолщения складок слизистой желудка и вздутия живота (рис. 3).

Хотя параметры газового состава крови и показатели общего анализа оставались в пределах референсного диапазона, наблюдалась небольшая анемия и слабый лейкоцитоз (табл. 1).

При биохимическом анализе крови наблюдались повышенные уровни лактатдегидрогеназы (LDH), креатинфосфокиназы (СРК), аспартатаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT), щелочной

фосфатазы (ALP), а также гипербилирубинемия и гипертриглицеридемия. Другие параметры были в пределах референсного диапазона (табл. 2).

С целью дифференциальной диагностики были проведены тесты по обнаружению антигена вируса лейкоза кошек (FeLV), антител к вирусу иммунодефицита кошек (FIV) (Asan Easy Test, Asan Pharm) и антител к вирусу инфекционного перитонита кошек (FIPV) (FASTest FIP Ab, Vetlab Supplies), на которые были получены отрицательные результаты.

Для лечения вводили внутривенно 0,9%-й изотонический раствор хлорида натрия (Polyplex, Polifarma[®]) в дозе 40 мл/кг; в качестве противорвотного и для уменьшения висцеральной боли использовали подкожно 1 мг/кг маропитанта (Cerenia, Zoetis[®]); внутривенную инъекцию N-ацетилцистеина (Nacosel, Haver Farma[®]) проводили в дозировке 140 мг/кг, а также применяли внутривенно витамины и аминокислоты (Duphalyte, Zoetis[®]). После проведенных процедур кот был выписан из лечебницы в удовлетворительном состоянии и с хорошим аппетитом. Для поддержания здоровья печени были назначены добавки: S-аденозин-L-метионин (SAMe) и силибин (Denamarin, Nutramax[®]) 15 мг/кг перорально в течение 21 сут,

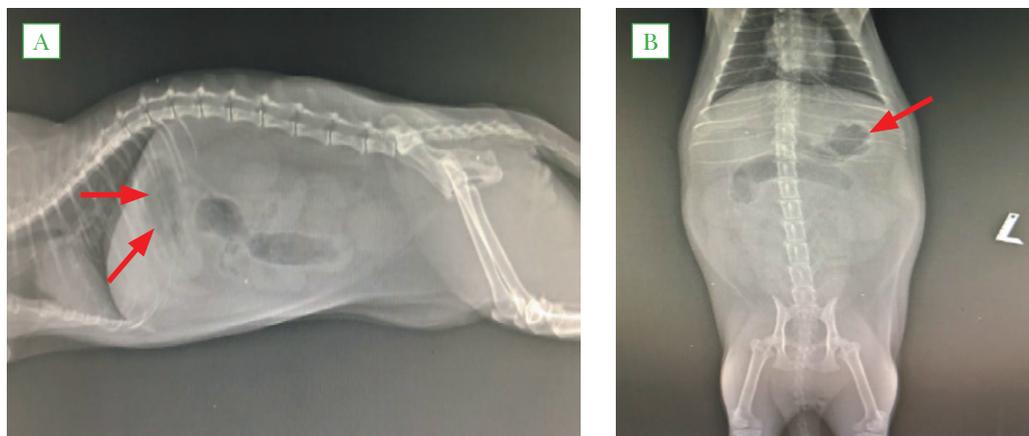


Рис. 2. Рентгенографическое исследование: А – рентгеноконтрастное в боковой проекции и В – вентродорсальное изображение утолщения стенки желудка

Fig. 2. Radiographic radiopaque (A) latero-lateral and (B) ventrodorsal image of the gastric wall thickening

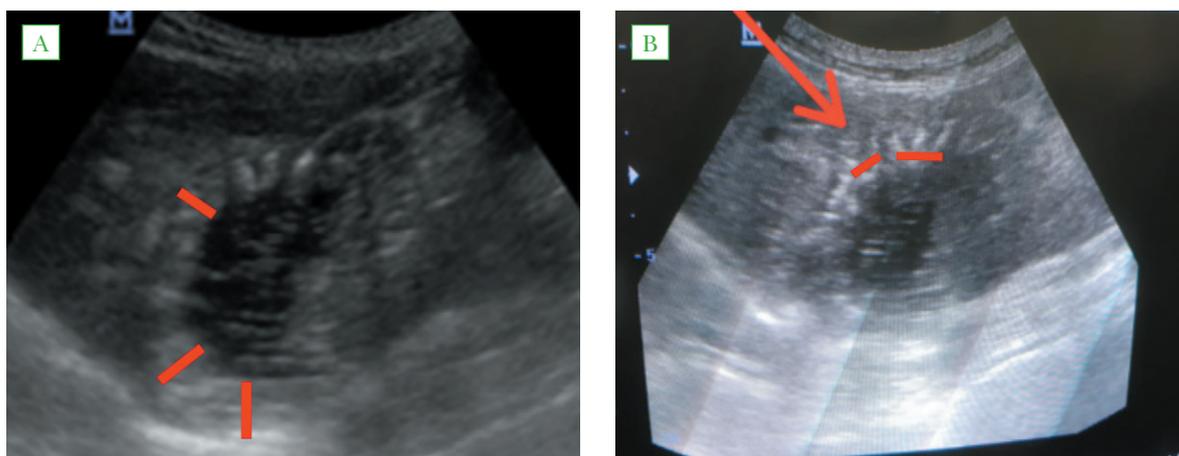


Рис. 3. Ультразвуковое исследование брюшной полости: А – утолщение складки слизистой желудка (5–6 мм), В – утолщение между складками слизистой желудка (3–4 мм)

Fig. 3. (A) Rugal fold thickness (5–6 mm) and (B) interrugal thickness (3–4 mm) in the abdominal ultrasonographic images

после применения которых животное полностью выздоровело.

ОБСУЖДЕНИЕ

Отравление грибами животных, а особенно кошек, регистрируются нечасто. В большинстве сообщений об ассоциированных с грибами интоксикациях вид грибов не указывается или указываются грибы неизвестного происхождения [1]. У кошек возможны отравления съедобными и несъедобными грибами, однако дан-

ные о видах ядовитых для кошек грибов и их токсических дозах отсутствуют. В целом грибы могут вызывать разнообразное неспецифическое клинические и клинико-патологические признаки, что затрудняет диагностику пищевых интоксикаций, ассоциированных с грибами [10].

Сморчки являются съедобными грибами, которые могут быть токсичными при неправильном способе их приготовления или при употреблении в сыром виде. Употребление внутрь сырых или ненадлежащим

Таблица 1
Газовый состав и данные общего клинического анализа крови (гемограмма)

Table 1
Blood gases and hemogram findings

Параметр	Выявленные показатели	Референсные показатели
pH (концентрация ионов водорода)	7,434	7,35–7,45
K (калий), ммоль/л	4,2	3,4–5,6
Na (натрий), ммоль/л	153	150–165
Cl (хлор), ммоль/л	119	104–128
Лактат, ммоль/л	1,8	0–2
Hct (гематокрит), %	29,8	29–48
Base (избыток/дефицит оснований стандартный) (Ecf), ммоль/л	–9,9	–4÷4
Base (избыток/дефицит оснований истинный) (B), ммоль/л	–8,8	–4÷4
HCO ₃ ⁻ (бикарбонат стандартный) (P, st), ммоль/л	17,3	19–24
HCO ₃ ⁻ (бикарбонат истинный) (P), ммоль/л	14,3	19–24
WBC (лейкоциты), м/мм³	21,32 ↑	5,0–19,0
RBC (эритроциты), м/мм³	3,50 ↓	4,0–9,0
MCV (средний объем эритроцитов), фл	43,3	35,5–55,0
Hct (гематокрит), %	24,4	24,0–45,0
MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах), г/дл	33,9	28,0–40,0
RDW (ширина распределения эритроцитов по объему)	9,3	8,0–12,0

Таблица 2
Показатели биохимического анализа сыворотки крови

Table 2
Serum biochemistry findings

Параметр	Выявленный показатель	Референсный показатель
BUN	26,5 мг/дл	14–36
Креатинин	1,0 мг/дл	0,6–2,4
AST	214 МЕ/л ↑	10–100
ALT	184 МЕ/л ↑	10–100
ALP	114 МЕ/л ↑	6–102
Амилаза	658 Ед/л МЕ/л	100–1200
Глюкоза	150 мг/дл	64–170
Магний	1,7 мг/дл	1,5–2,5
LDH	780 МЕ/л ↑	20–500
Общий билирубин	0,9 мг/дл ↑	0,1–0,6
Прямой билирубин	0,5 мг/дл ↑	0–0,4
Фосфор	4,4 мг/дл	2,4–8,2
Холестерин	157 мг/дл	75–220
Альбумин	2,9 мг/дл	2,5–3,9
Кальций	7,8 мг/дл	8,2–10,8
Триглицерид	248 мг/дл ↑	25–160
Гамма-лутамилтрансфераза	1 МЕ/л	1–10
Протеин	6,8 г/дл	5,2–8,8
СРК	2162 МЕ/л ↑	50,00–450,00

образом приготовленных сморчков может вызывать нарушение работы желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, абдоминальные боли, диарея и т. д.), однако мы не располагаем данными о сроках появления таких симптомов. Согласно предыдущим сообщениям, неврологические признаки появлялись в среднем через 10 ч (12 ч – в нашем случае) после употребления внутрь *Morchella* sp. Признаки и симптомы были сходными с теми, которые наблюдались в нашем случае, и включали дезориентацию, тремор, нестабильность походки, нарушение координации движений, расстройство работы желудочно-кишечного тракта и нарушение зрения [11, 12]. В нашем случае желудочно-кишечные симптомы были ярко выраженными.

Повышенное содержание СРК в крови свидетельствует о повреждении мышечных волокон из-за мышечного тремора. Повышенные уровни AST, ALT, ALP и гипербилирубинемия могли быть результатом гепатотоксикоза или реактивного изменения печени при воспалении желудочно-кишечного тракта [10]. Свидетельством употребления внутрь строчков считался анамнез, предоставленный хозяином животного, и данные о наличии большого количества данного вида грибов в районе проживания кота, а также присутствие спор ложных сморчков при исследовании фекалий. Кроме этого, с помощью лабораторных исследований были исключены болезни, вызываемые вирусами лейкоза

кошек (FeLV), иммунодефицита кошек (FIV) и инфекционного перитонита кошек (FIPV).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Съедобные сморчки собирают повсеместно, они считаются безопасными для употребления в пищу. Их можно отличить от ложных по внешнему виду (*G. esculenta* поверхность шляпки сморщенная, мозговидно-сладчатая). Отравление строчками характеризуется желудочно-кишечными расстройствами, возникающими через 6–12 сут после употребления, в тяжелых случаях может стать причиной гепатита, нефрита и неврологических расстройств, таких как тремор, нарушение координации и судороги [13]. Обычно считается, что развитие неврологических признаков или симптомов зависит от дозы отравляющего вещества, т. е. характеризуется дозозависимым эффектом [14].

Отравление грибами рассматривалось как самый вероятный диагноз, он был подтвержден на основании анамнеза, обнаружения спор строчков при исследовании фекалий, а также биохимического анализа крови. Учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод о важности проведения именно этих исследований при подозрении на отравление кошек грибами. К сожалению, в данной работе не удалось дать систематическую микологическую идентификацию. Тяжесть отравления зависит от количества употребленного

токсина, времени, прошедшего с момента употребления, и сопутствующих заболеваний животного [10]. В Информационную службу ветеринарных ядов (VPIS) Великобритании поступило 867 запросов для предоставления информации о лечении при отравлении грибами собак, тогда как сообщений об отравлении кошек было лишь 57 [15]. Поэтому считаем важным, чтобы в научном сообществе происходил обмен информацией о случаях интоксикации животных, ассоциированных с грибами, или об исследованиях в данной области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Puschner B., Wegenast C. Mushroom poisoning cases in dogs and cats: Diagnosis and treatment of hepatotoxic, neurotoxic, gastroenterotoxic, nephrotoxic and muscarinic mushrooms. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 2012; 42 (2): 375–387. DOI: 10.1016/j.cvasm.2011.12.002.
2. Tokarz D., Poppenga R., Kaae J., Filigenzi M., Lowenstine L., Pesavento P. Amanitin toxicosis in two cats with acute hepatic and renal failure. *Vet. Pathol.* 2012; 49 (6): 1032–1035. DOI: 10.1177/0300985811429307.
3. Richard F., Bellanger J., Clowez P., Hansen K., O'Donnell K., Urban A., et al. True morels (*Morchella*, *Pezizales*) of Europe and North America: Evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy. *Mycologia.* 2015; 107 (2): 359–382. DOI: 10.3852/14-166.
4. Güngör S., Arslan M. Beşehir ilçesi ve yakın çevresi turizm ve rekreasyon kullanımına yönelik peyzaj potansiyelinin saptanması üzerine bir araştırma [A research on the determination of landscape potential aimed at tourism and recreational usage of the province of Beşehir and its environs]. *S. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi.* 2003; 17 (32): 64–73. Available at: <https://docplayer.biz.tr/47202112-S-u-ziraat-fakultesi-dergisi-17-32-2003-64-73.html>. (in Turkish)
5. Pekşen A. Mantar zehirlenmeleri ve başlıca zehirli mantarlar. *Ordu'da Gıda Güvenliği Dergisi.* 2015; 25: 11–17. Available at: <https://ordu.tarimor->

man.gov.tr/Belgeler/G%C4%B1da%20Dergisi/say%C4%B1%2025.pdf. (in Turkish)

6. Michelot D., Toth B. Poisoning by *Gyromitra esculenta* – a review. *J. Appl. Toxicol.* 1991; 11 (4): 235–243. DOI: 10.1002/jat.2550110403.
7. Gerault A. Les champignons superieurs et leurs intoxications; les gyromitres toxiques: Thesis for PhD degree. Rennes. 1976; 209–216. (in French)
8. Horowitz K. M., Kong E. L., Horowitz B. Z. *Gyromitra* Mushroom Toxicity. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. PMID: 29262102. Available at: <https://www.statpearls.com/keywordarticle/30355>.
9. Eisner M., Kurowski M., Pilarska K., Koszarska J., Goertz J. *Gyromitra esculenta* poisoning. *Pol. Tyg. Lek.* 1973; 28 (49):1536–1539.
10. Liatis T., Adamama-Moraitou K., Pardali D., Kavarnos I., Bates N., Rallis T. Exposure of a cat to human – edible mushrooms: were they toxic? *HJCAM.* 2018; 7 (2): 50–54. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/329574445>.
11. Piqueras J. Intoxicaciones por setas. *Diario del alto Aragon.* Ediciones del Alto Aragón SA. Huesca; 1999; 111–125. (in Spanish)
12. Piqueras J. La toxicidad de las colmenillas (*Morchella* sp.). *Lactarius.* 2003; 12: 83–87. (in Spanish)
13. Benjamin D. R. *Mushrooms: Poisons and Panaceas: a Handbook for Naturalists, Mycologists, and Physicians.* NY: W. H. Freeman & Company; 1995; 265–282.
14. Saviuc P., Harry P., Pulce C., Garnier R., Cochet A. Can morels (*Morchella* sp.) induce a toxic neurological syndrome? *Clin. Toxicol.* 2010; 48 (4): 365–372. DOI: 10.3109/15563651003698034.
15. Herreria-Bustillo V. J., Saiz-Alvarez R., Jasani S. Suspected muscarinic mushroom intoxication in a cat. *J. Feline Med. Surg.* 2013; 15: 160–162. DOI: 10.1177/1098612X12463010.

Поступила 07.05.2020

Принята в печать 23.06.2020

Received on 07.05.2020

Approved for publication on 23.06.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Erdem Gülersoy, доктор ветеринарной терапии, Университет Сельчук, факультет ветеринарной медицины, г. Конья, Турция.

Tuğçe Manolya Baş, аспирант (ветеринарная терапия), Университет Сельчук, факультет ветеринарной медицины, г. Конья, Турция.

Mahmut Ok, профессор ветеринарной терапии, руководитель ветеринарной лечебницы факультета ветеринарной медицины, Университета Сельчук, г. Конья, Турция.

Erdem Gülersoy, Doctor of Veterinary Internal Medicine, Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Konya, Turkey.

Tuğçe Manolya Baş, Post-Graduate Student (Veterinary Internal Medicine), Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Konya, Turkey.

Mahmut Ok, Professor of Veterinary Internal Medicine, Head of Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital, Konya, Turkey.

Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В

М. С. Фирсова¹, В. А. Евграфова², А. В. Потехин³, Р. В. Яшин⁴, О. В. Прунтова⁵, В. С. Русалеев⁶

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

¹ ORCID 0000-0002-1531-004X, e-mail: firsova@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-3053-6976, e-mail: evgrafova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-3529-4809, e-mail: andrey@biokorm.cat

⁴ ORCID 0000-0002-1385-705X, e-mail: yashin@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-4972-6326, e-mail: rusaleev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Инфекционное заболевание кур, вызываемое бактерией *Avibacterium paragallinarum*, остается одной из актуальных проблем птицеводческой отрасли, о чем говорят многочисленные сообщения о периодических вспышках инфекционного ринита кур в разных странах мира. Проведенные с 2014 по 2019 г. бактериологические исследования показали, что Российская Федерация эндемична по данному заболеванию, вызываемому *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В. Представлены результаты исследования по изучению иммуногенных свойств антигенов 13 изолятов возбудителя инфекционного ринита кур, выделенных из патологического материала, доставленного в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с птицефабрик Российской Федерации и Республики Беларусь. Для этого готовили образцы вакцины, содержащей в своем составе инактивированные формалином клетки *Avibacterium paragallinarum* и масляный адъювант. Птиц иммунизировали с последующим контрольным заражением гомологичными и гетерологичными изолятами. Степень проявления клинических признаков заболевания оценивали по методике, предложенной V. E. Soriano. Образец вакцины на основе антигена изолята АрВ08 индуцировал недостаточный иммунный ответ у птиц при инфицировании изолятами АрВ04 и АрВ12. В свою очередь, при заражении изолятом АрВ08 был показан высокий уровень защиты животных. Изоляты АрВ04, АрВ08 и АрВ12 были всесторонне изучены, определены как наиболее перспективные для производства вакцины против инфекционного ринита кур и депонированы в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» под номерами 1116, 5111 и 1818 соответственно. Также была проведена сравнительная оценка иммуногенной активности экспериментальной вакцины против инфекционного ринита кур, включающей антигены штаммов № 1116, 5111 и 1818, с двумя коммерческими препаратами. Экспериментальный препарат показал максимальный процент защиты птиц при заражении гомологичными штаммами *Avibacterium paragallinarum*.

Ключевые слова: инфекционный ринит кур, изоляты, штаммы, вакцина, контрольное заражение, *Avibacterium paragallinarum*.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Фирсова М. С., Евграфова В. А., Потехин А. В., Яшин Р. В., Прунтова О. В., Русалеев В. С. Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 205–212. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-205-212.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Фирсова Маргарита Сергеевна, аспирант, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: firsova@arriah.ru.

Immunogenic characteristics of *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) isolates and strains

M. S. Firsova¹, V. A. Yevgrafova², A. V. Potekhin³, R. V. Yashin⁴, O. V. Pruntova⁵, V. S. Russaleyev⁶

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

¹ ORCID 0000-0002-1531-004X, e-mail: firsova@arriah.ru

² ORCID 0000-0003-3053-6976, e-mail: evgrafova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-3529-4809, e-mail: andrey@biokorm.cat

⁴ ORCID 0000-0002-1385-705X, e-mail: yashin@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0003-3143-7339, e-mail: pruntova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-4972-6326, e-mail: rusaleev@arriah.ru

SUMMARY

Infectious disease of chickens caused by the bacterium *Avibacterium paragallinarum* remains one of the urgent problems of the poultry industry, as evidenced by numerous reports of recurrent infectious coryza outbreaks in chickens around the world. Bacteriological tests performed in 2014–2019 demonstrated that the disease caused by *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) is endemic in the Russian Federation. The paper presents the results of tests for immunogenic properties of antigens of 13 infectious coryza isolates recovered from the pathological material delivered to the FGBI "ARRIAH" from poultry farms of the Russian Federation and the Republic of Belarus. For this, samples of the vaccine containing formalin-inactivated *Avibacterium paragallinarum* cells and an oil adjuvant were prepared. The poultry was immunized followed by challenge with homologous and heterologous isolates. The degree of manifestation of the disease clinical signs was assessed according to the method proposed by V. E. Soriano. The vaccine sample based on the antigen of the ApB08 isolate induced an insufficient immune response in poultry when infected with the ApB04 and ApB12 isolates. Conversely, a high level of animal protection was demonstrated when infected with the ApB08 isolate. ApB04, ApB08 and ApB12 isolates were comprehensively studied, identified as the most promising for production of vaccines against infectious coryza in chickens, and deposited in the FGBI "ARRIAH" Microorganism Strain Collection under numbers 1116, 5111 and 1818, respectively. Also, a comparative assessment of potency of the experimental vaccine and two commercial products against infectious coryza, including antigens of strains No. 1116, 5111 and 1818, was performed. The experimental vaccine demonstrated maximum protection against infection with *Avibacterium paragallinarum* homologous strains.

Key words: infectious coryza, isolates, strains, vaccine, challenge infection, *Avibacterium paragallinarum*.

Acknowledgements: The work was carried out at the expense of the FGBI "ARRIAH" within the framework of the research topic "Animal disease freedom".

For citation: Firsova M. S., Yevgrafova V. A., Potekhin A. V., Yashin R. V., Pruntova O. V., Russaleyev V. S. Immunogenic characteristics of *Avibacterium paragallinarum* (serogroup B) isolates and strains. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 205–212. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-205-212.

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

For correspondence: Margarita S. Firsova, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: firsova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем такого инфекционного заболевания кур, как инфекционный ринит (гемофилез), является представитель семейства *Pasteurellaceae* бактерия *Avibacterium paragallinarum*, известная ранее как *Haemophilus paragallinarum*. Болезнь может возникать самостоятельно, а также проявляться в виде ассоциации с другими инфекционными заболеваниями [1–4].

Многочисленные сообщения о периодических вспышках гемофилеза кур в разных странах мира свидетельствуют об актуальности проблемы данного заболевания. Бактериологические исследования, проведенные в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 2014 по 2019 г., показали, что Российская Федерация эндемична по инфекционному риниту кур, вызываемому *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В.

Экономические потери при возникновении инфекции могут быть значительными, в первую очередь они обусловлены оставанием цыплят в росте и снижением яйценоскости у кур на пике продуктивности до 40% в течение 2–3 недель [5, 6]. Заболевание характеризуется отеком гиподермы кожи головы и серозно-фибринозным воспалением инфраорбитальных синусов, воздухоносных мешков и слизистой оболочки верхних дыхательных путей. При ассоциативном течении может увеличиваться продолжительность и тяжесть заболевания. Нарушение микроклимата в птичнике может провоцировать появление инфекции, что впоследствии приводит к увеличению падежа птиц до 20–40% [7].

Источником инфекции являются больные особи. Возбудитель может циркулировать в стаде длительное время, это особенно актуально для небольших ферм, содержащих птицу разных возрастов. При возникновении заболевания в таких хозяйствах очень трудно избавиться от патогена или контролировать его. Воз-

будитель передается аэрогенно и с питьевой водой. Инкубационный период составляет от 1 до 10 сут при продолжительности заболевания от 14 до 21 сут.

Одной из наиболее эффективных мер борьбы с инфекционным ринитом кур является специфическая профилактика. Вакцинация позволяет снизить зависимость от постоянного применения антибактериальных препаратов, что, в свою очередь, обеспечивает экономию средств, а также предотвращает проблемы, связанные с антибиотикорезистентностью микроорганизмов или остаточными количествами антибиотиков в продукции птицеводства. Однако основным препятствием при изготовлении эффективной инактивированной вакцины является выбор производственных штаммов возбудителя, при этом следует учитывать, что антигенная структура *A. paragallinarum* сложна и разнообразна, а индуцируемый иммунный ответ у кур является серотипспецифическим, с частичной перекрестной защитой между отдельными серотипами.

Серологическое типирование *A. paragallinarum* наиболее часто проводят по двум взаимосвязанным схемам. По схеме Л. Пейджа в реакции агглютинации определяют три серогруппы возбудителя – А, В и С, по схеме К. Кумэ в реакции торможения гемагглютинации – девять серотипов (А1–А4, В-1 и С1–С4) [8, 9].

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрирован ряд зарубежных препаратов для специфической профилактики инфекционного ринита кур, которые различаются по составу, технологии производства, схеме применения и эффективности. Большинство из них обеспечивают защиту против наиболее распространенных серотипов возбудителя, что является их несомненным достоинством. Универсальность препаратов обусловлена наличием перекрестной защиты между серотипами внутри серогруппы А, а также

между отдельными серотипами серогруппы С. Намного сложнее обстоит дело с выбором штамма серогруппы В. По схеме, предложенной К. Кумэ, в серогруппе В имеется только один серотип (В-1), однако по уровню иммуногенной активности между отдельными штаммами/изолятами наблюдается лишь частичная перекрестная защита [10–12].

В последние годы в Европе и Азии участились вспышки, обусловленные *A. paragallinarum* серотипа В-1, иногда на фоне использования коммерческих вакцин против инфекционного ринита кур [5]. При этом причина слабой перекрестной защиты между различными штаммами серотипа В-1 до сих пор не установлена. По данным ряда исследователей, данный серотип получил широкое распространение в Аргентине, Бразилии, Китае, Эквадоре, Египте, Индонезии, Мексике, Перу, Южной Африке, Испании, Соединенных Штатах Америки и Зимбабве, на Филиппинах [6, 11].

Поскольку различные штаммы серотипа В-1 обеспечивают лишь частичную перекрестную защиту между собой, то априори можно предполагать, что эффективная вакцина может быть изготовлена только из нескольких штаммов, выделенных в конкретном географическом регионе, где данный серотип является эндемичным. Кроме того, эффективными могут оказаться и коммерческие вакцины, содержащие в составе антигены нескольких вариантов штаммов серотипа В-1.

Слабая перекрестная защита между различными штаммами/изолятами серогруппы В, возможно, связана с их высокой вирулентностью и ведущей ролью различных факторов патогенности [3, 13].

При исследовании патологического материала от птиц, доставленного в период с 2014 по 2018 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из различных регионов Российской Федерации и Республики Беларусь, бактериологическим методом было получено 13 изолятов возбудителя

инфекционного ринита кур. Анализ серологического профиля патогена показал преобладание циркуляции *A. paragallinarum* серогруппы В [3].

В 2016 г. на двух крупных птицефабриках Российской Федерации, неблагополучных по гемофилезу и применявших коммерческую трехвалентную эмульсионную вакцину против инфекционного ринита кур, при серологическом типировании изолятов, выделенных из материала от больной птицы, была установлена их принадлежность к серогруппе В. Данный факт позволяет усомниться в универсальности используемой вакцины на территории нашей страны. Поэтому проведение исследований по поиску перспективных штаммов *A. paragallinarum* серогруппы В будет способствовать созданию конкурентоспособной отечественной вакцины.

Целью данных исследований явилось изучение иммуногенных свойств изолятов и штаммов *A. paragallinarum* серогруппы В, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь, и возможность их использования при разработке вакцинных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изоляты возбудителя. В работе использовали 13 изолятов (АрВ01–АрВ13) *A. paragallinarum* серогруппы В, выделенных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из материала от кур с птицефабрик Российской Федерации и Республики Беларусь [3]. Происхождение изолятов представлено в таблице 1.

Культивирование изолятов. В качестве ростовой среды для культивирования *A. paragallinarum* использовали агар и бульон Колумбия (Becton Dickinson and Co., США), содержащие такие факторы роста: 20 мкг/мл никотинамидадениндинуклеотида (NAD, AppliChem, Германия) и 5% сыворотки крови лошади.

Таблица 1
Происхождение изолятов *A. paragallinarum*

Table 1
A. paragallinarum isolate origin

Наименование изолята	Локализация возбудителя при выделении	Год выделения	Регион
АрВ01	Подглазничные синусы	2014	Костромская область
АрВ02	Конъюнктивальный мешок	2014	Московская область
АрВ03	Подглазничные синусы	2015	Московская область
АрВ04	Подглазничные синусы	2015	Республика Беларусь
АрВ05	Подглазничные синусы	2016	Республика Татарстан
АрВ06	Легкие	2016	Владимирская область
АрВ07	Подглазничные синусы	2016	Ярославская область
АрВ08	Подглазничные синусы	2016	Оренбургская область
АрВ09	Подглазничные синусы	2017	Ульяновская область
АрВ10	Подглазничные синусы	2017	Московская область
АрВ11	Подглазничные синусы	2017	Владимирская область
АрВ12	Подглазничные синусы	2018	Республика Мордовия
АрВ13	Подглазничные синусы	2018	Ярославская область

Культивирование бактерий на агаровой среде проводили при температуре 37 °С в течение 24 ч в условиях повышенного содержания углекислого газа, в жидкой питательной среде – при температуре 37 °С в течение 18 ч в условиях обычной атмосферы в орбитальном шейкере-инкубаторе при 150 об/мин.

Получение антигенов. Инактивацию изолятов *A. paragallinarum* проводили раствором формальдегида при температуре 37 °С в течение 48 ч, при этом конечная концентрация формалина составляла 0,2% по объему. Затем клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при температуре 4 °С, осадок ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 до концентрации 100 ед. (10¹⁰ м. к./см³) по оптическому стандарту мутности. Полученные антигены хранили при температуре (2–8) °С [3].

Подопытная птица. В работе использовали кур 10-недельного возраста кросса Хайсекс Браун. Птицы были доставлены из хозяйства, благополучного по инфекционному риниту кур. Во всех экспериментах количество птиц в опытных и контрольных группах составляло по 10 голов.

Все эксперименты на подопытных птицах 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.

Изготовление и применение образцов вакцин. Для изготовления опытных моно- и полиштаммовых образцов вакцин использовали антигены 13 изолятов *A. paragallinarum*. Суспензии антигенов смешивали с масляным адьювантом Montanide ISA 70 VG (Seppic, Франция) в соотношении 30:70 по весу на лабораторном гомогенизаторе Silverson L4RT. Концентрация каждого антигена в прививной дозе 0,5 см³ составляла 5×10⁸ м. к. по оптическому стандарту мутности. Препараты вводили двукратно с интервалом 21 сут подкожно, в область средней трети шеи с дорсальной стороны в каудальном направлении.

В качестве сравнительного контроля использовали две коммерческие вакцины, зарегистрированные на территории Российской Федерации.

Определение иммуногенных свойств образцов вакцин. Иммуногенные свойства антигенов определяли методом вакцинации и последующего контрольного заражения иммунизированных птиц гомологичным и гетерологичными изолятами. Кур заражали интраназально суточными бульонными культурами изолятов в дозе 0,5 см³, содержащей 10⁸ КОЕ возбудителя.

Учет результатов заражения. Степень проявления клинических признаков заболевания оценивали по методике, предложенной V. E. Soriano [14].

Тяжесть поражения верхних дыхательных путей у зараженной птицы оценивали по балльной системе:

- 0 – отсутствие клинических признаков;
- 1 – слабые истечения из носовых ходов и/или незначительное опухание области подглазничных синусов;
- 2 – умеренное истечение из носовых ходов и/или умеренное опухание области подглазничных синусов;
- 3 – обильные носовые истечения и/или выраженное опухание подглазничных синусов;

4 – обильные носовые истечения и выраженное опухание подглазничных синусов, хрипы.

Проводили ежедневный учет клинических признаков у каждой птицы. Через 7 сут после заражения суммировали баллы по каждой группе, которые делили на общее количество зараженных птиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используемые в работе изоляты АрВ01–АрВ13 *A. paragallinarum* были выделены в период с 2014 по 2018 г. от птиц с респираторной патологией в возрасте от 38 до 211 сут из хозяйств Владимирской, Костромской, Московской, Оренбургской, Ульяновской и Ярославской областей, республик Мордовия и Татарстан, один изолят был выделен от птиц из Республики Беларусь.

Изоляты АрВ04 и АрВ08 были выделены при вспышке инфекционного ринита от кур спустя 1–2 мес. после применения коммерческих вакцин, содержащих в составе антигены серогрупп А, В и С.

В большинстве случаев клинические признаки у больных кур были однотипны и проявлялись в виде опухания подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков, иногда наблюдали водянистые истечения из носовых отверстий. У некоторых особей отмечали ротовое дыхание с хрипами вследствие закупорки носовых ходов. Большинство изолятов *A. paragallinarum* были выделены от птиц яичного направления продуктивности. Основным местом локализации возбудителя были подглазничные синусы. На агаровых средах через 24 ч инкубирования культуры формировали колонии круглой и выпуклой формы, с ровными краями и гладкой поверхностью, серого цвета, диаметром 0,5–1,0 мм (S-форма). Характерным признаком 24-часовых культур являлась флуоресценция колоний в коспроходящем свете, что свидетельствовало о наличии капсулы у бактерий.

В предыдущих исследованиях мы проводили изучение вирулентных свойств изолятов *A. paragallinarum* серогруппы В для кур. При заражении птиц различными изолятами *A. paragallinarum* отмечали одинаковую продолжительность периодов течения заболевания. У больных кур наблюдали сходные клинические признаки, проявляющиеся ринитом, синуситом и конъюнктивитом [1].

При изучении иммуногенных свойств изолятов вначале была проведена пробная иммунизация ($n = 1$) цыплят образцом вакцины с антигеном АрВ08 с наименьшим заражением гомологичным и гетерологичными изолятами. Выбор данного изолята был обусловлен тем, что при культивировании на питательной среде он накапливался в высокой концентрации с сохранением стабильной гемагглютинирующей активности и высокого уровня вирулентности.

Результаты заражения птиц, иммунизированных образцом вакцины с антигеном изолята АрВ08, представлены в таблице 2.

Эксперимент показал, что иммунизация образцом вакцины с антигеном изолята АрВ08 обеспечивала защиту птиц на уровне не менее 80% при заражении гомологичным и гетерологичными изолятами, кроме АрВ04 и АрВ12. При заражении птиц контрольных групп наблюдали заболеваемость на уровне не менее 80% с развитием типичных для инфекционного ринита симптомов. Первые клинические признаки у птиц

Таблица 2

Иммуногенные свойства антигена АрВ08 при заражении кур гомологичным и гетерологичными изолятами ($n = 1$)

Table 2

Immunogenic characteristics of ApV08 antigen when infecting chickens with the homologous and heterologous isolates ($n = 1$)

Изолят \ Группа	Вакцина с антигеном изолята АрВ08		Контроль	
	% P	S	% D	S
АрВ01	100	0	100	1,8
АрВ02	100	0	80	1,8
АрВ03	80	0,8	100	2,2
АрВ04	20	2,8	100	3,0
АрВ05	100	0	100	1,6
АрВ06	100	0	100	1,8
АрВ07	80	0,6	90	1,2
АрВ08	100	0	100	2,2
АрВ09	80	0,8	100	2,4
АрВ10	100	0	100	1,8
АрВ11	100	0	100	1,6
АрВ12	0	3,0	100	3,2
АрВ13	80	0,8	100	2,4

% P – процент защиты, наблюдаемый при заражении (protection rate observed at the infection);

% D – процент заболевших животных при заражении (percent of the diseased animals at the infection);

S – тяжесть проявления клинических признаков (severity of the manifested clinical signs) (no V. E. Soriano [12]).

наблюдали через 24–48 ч после заражения. Клинически заболевание проявлялось водянистым истечением из носовых отверстий и незначительным одно- или двусторонним опуханием подглазничных синусов. В ряде случаев клинические признаки ограничивались указанными симптомами. У некоторых птиц экссудат постепенно мутнел и приобретал слизистую консистенцию, вследствие чего обтурировал носовые отверстия, и птица начинала дышать через рот. У большинства зараженных птиц заболевание сопровождалось выраженным опуханием подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков, при этом у больных кур отмечали угнетение, сонливость и плохое поедание

корма. Иногда, вследствие закупорки слезно-носового канала, экссудат через небную щель проникал в ротовую полость. Вытекающим экссудатом загрязнялись перья в области шеи и крыльев. У некоторых птиц развивался односторонний или двусторонний катаральный конъюнктивит, впоследствии в экссудате появлялся фибрин, веки опухали, глазная щель сужалась. При локализации инфекции в более глубоких отделах респираторного тракта у некоторых особей дыхание сопровождалось хрипами. Самые тяжелые симптомы заболевания наблюдали у птиц в группах, зараженных изолятами АрВ03, АрВ04, АрВ08, АрВ09, АрВ12 и АрВ13.

Таблица 3

Иммуногенные свойства антигенов АрВ04, АрВ08, АрВ12 при контрольном заражении гомологичными и гетерологичными изолятами ($n = 3$)

Table 3

Immunogenic characteristics of ApV04, ApV08, ApV12 antigens at the control challenge with the homologous and heterologous isolates ($n = 3$)

Группа птиц	Антиген изолята	% защиты птиц при контрольном заражении изолятом		
		АрВ04	АрВ08	АрВ12
Иммунизированные	АрВ04	93,3 ± 13,1	20,0	26,7 ± 13,1
	АрВ08	6,7 ± 13,1	86,7 ± 13,1	6,7 ± 13,1
	АрВ12	13,3 ± 13,1	20,0	93,3 ± 13,1
Интактные	–	0	0	6,7 ± 13,1

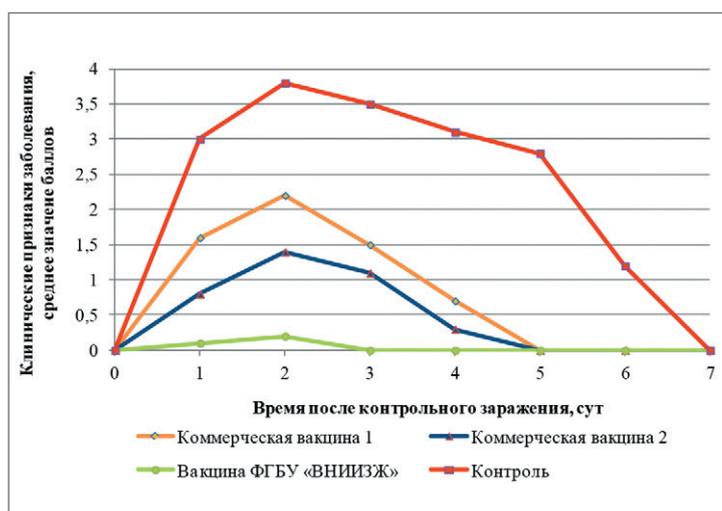
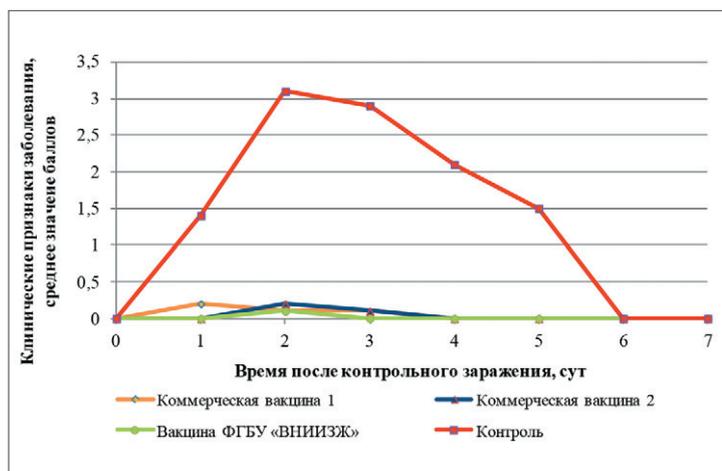
Таблица 4

Сравнительная оценка иммуногенности коммерческих поливалентных вакцин и экспериментальной моновалентной вакцины после заражения штаммами № 1116, 5111, 1818 *A. paragallinarum* ($n = 3$)

Table 4

Comparative assessment of potency of the commercial polyvalent vaccines and the experimental monovalent vaccine after infection with *A. paragallinarum* strains No. 1116, 5111, 1818 ($n = 3$)

Вакцина	% защиты птиц при контрольном заражении штаммом		
	№ 1116	№ 5111	№ 1818
Коммерческая вакцина 1	46,6 ± 13,1	86,6 ± 6,5	53,3 ± 17,3
Коммерческая вакцина 2	40,0 ± 11,3	90,0 ± 11,3	53,3 ± 13,1
Вакцина ФГБУ «ВНИИЗЖ»	96,6 ± 6,5	100	90,0 ± 11,3
Контроль	0	0	0

Рис. 1. Клинические профили вакцинированных и невакцинированных птиц при заражении штаммом № 1116 *A. paragallinarum*Fig. 1. Clinical profiles of vaccinated and non-vaccinated poultry infected with *A. paragallinarum* strain No. 1116Рис. 2. Клинические профили вакцинированных и невакцинированных птиц при заражении штаммом № 5111 *A. paragallinarum*Fig. 2. Clinical profiles of vaccinated and non-vaccinated poultry infected with *A. paragallinarum* strain No. 5111

Для подтверждения выявленных различий протективных свойств антигенов АрВ04, АрВ08 и АрВ12 был проведен дополнительный эксперимент по иммунизации с последующим контрольным заражением гомологичными и гетерологичными изолятами (табл. 3).

При заражении иммунизированной птицы гомологичными изолятами процент защиты составлял не менее $86,7 \pm 13,1\%$, а при заражении гетерологичными изолятами – не превышал $26,7 \pm 13,1\%$ ($p \leq 0,05$). В результате проведенных исследований было установлено, что по иммуногенной активности образцы с изолятами АрВ04, АрВ08 и АрВ12 существенно различаются между собой и поэтому являются перспективными для производства вакцины. Изоляты были всесторонне изучены и депонированы в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» как штаммы № 1116, 5111, 1818 соответственно.

На следующем этапе работы провели сравнительные испытания экспериментальной моновалентной вакцины производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», включающей антигены штаммов № 1116, 5111, 1818, с двумя коммерческими поливалентными вакцинами (табл. 4).

Результаты проведенных исследований показали, что обе коммерческие вакцины вызывают недостаточный иммунный ответ у птиц при заражении штаммами № 1116 и 1818.

Кроме определения иммуногенности исследуемых вакцин провели оценку клинического профиля вакцинированных и невакцинированных птиц, которая включала определение тяжести течения и продолжительности заболевания при заражении штаммами № 1116, № 5111 и 1818 *A. paragallinarum* (рис. 1–3).

Как видно из рисунка 1, после контрольного заражения вакцинированных и невакцинированных птиц штаммом № 1116 инкубационный период заболевания составлял менее 24 ч. Максимальное развитие клинических признаков заболевания наблюдали спустя 48 ч после заражения. По данным ряда исследователей [8, 9, 11], при интраназальном заражении птиц инкубационный период составляет 24–48 ч, при контакте в клетках больной и здоровой птицы – 3 сут, а при аэрогенной передаче возбудителя – до 6 сут. На третьи сутки у птиц контрольной группы и иммунизированных коммерческими вакцинами наблюдали снижение выраженности симптомов заболевания, а в группе птиц, иммунизированных вакциной ФГБУ «ВНИИЗЖ» из гомо-

логичного штамма, – полное выздоровление. Продолжительность течения заболевания у птиц контрольной группы составляла 7 сут, а у кур, иммунизированных коммерческими вакцинами, – 5 сут.

Как видно на рисунке 2, инкубационный период заболевания у птиц контрольной группы составлял менее 24 ч, а максимальное развитие клинических признаков заболевания наблюдали через 48 ч после заражения, при этом величина среднего балла составила 3,1. Вакцина ФГБУ «ВНИИЗЖ» обеспечила выраженную защиту птиц при контрольном заражении штаммом № 5111. Обе коммерческие вакцины также показали высокую степень защиты при заражении штаммом № 5111, что свидетельствует о наличии перекрестного иммунитета между штаммами.

Как видно из рисунка 3, результаты заражения штаммом № 1818 во многом сходны с таковыми для штамма № 5111. Наиболее выраженное развитие клинических признаков заболевания у птиц контрольной группы наблюдали спустя 48 ч после заражения, при этом средний балл составил 3,8. У большинства заболевших птиц клинические признаки ограничивались слабым, умеренным или выраженным опуханием подглазничных синусов и конъюнктивальных мешков, у больных кур отмечали угнетение, сонливость и плохое поедание корма. На третьи сутки после заражения у птиц контрольной и опытных групп наблюдали снижение выраженности симптомов заболевания. Продолжительность течения заболевания у птиц контрольной группы составила 7 сут, у кур, иммунизированных коммерческими вакцинами, – 4 и 5 сут соответственно, а у птиц, привитых вакциной ФГБУ «ВНИИЗЖ», – 3 сут. По данным ряда исследователей [7, 8, 11], длительность заболевания кур в естественных условиях обычно составляет 2–3 недели, а при экспериментальной инфекции – 5–7 сут.

Частичная перекрестная защита между вакцинным штаммом и полевыми изолятами *A. paragallinarum* серогруппы В не обеспечивает положительного эффекта при иммунизации птиц [10, 11, 12, 13]. Поэтому в связи с вероятностью отсутствия перекрестного защитного механизма между штаммами *A. paragallinarum* серогруппы В наиболее предпочтительными являются вакцины, содержащие максимально возможный набор штаммов возбудителя, актуальных для региона применения. Кроме того, практика многих стран показывает, что наиболее эффективным в данной ситуации является применение аутогенных вакцин, с помощью которых удается получить эффект против любого циркулирующего серотипа возбудителя [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение иммуногенных свойств антигенов 13 изолятов *A. paragallinarum* серогруппы В, выделенных из патологического материала от кур, доставленного в ФГБУ «ВНИИЗЖ» с птицефабрик Российской Федерации и Республики Беларусь, показало, что образцы вакцины на основе антигенов изолятов АрВ04, АрВ08 и АрВ12 индуцировали недостаточный иммунный ответ у птиц при перекрестном заражении гетерологичными изолятами. Процент защиты составил $26,7 \pm 13,1\%$, в свою очередь, при заражении гомологичными изолятами был показан высокий уровень защиты – $86,7 \pm 13,1\%$ ($p \leq 0,05$). Изоляты АрВ04, АрВ08 и АрВ12 были всесторонне изучены, определены как наиболее

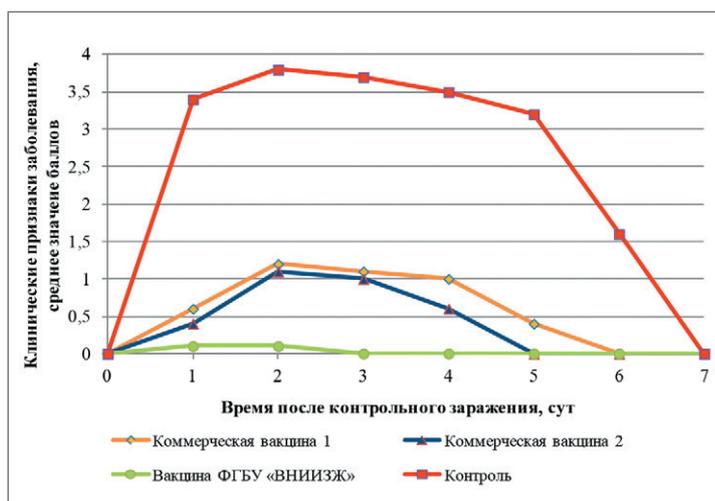


Рис. 3. Клинические профили вакцинированных и невакцинированных птиц при заражении штаммом № 1818 *A. paragallinarum*

Fig.3. Clinical profiles of vaccinated and non-vaccinated poultry infected with *A. paragallinarum* strain No. 1818

перспективные для производства вакцины против инфекционного ринита кур и депонированы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» под номерами 1116, 5111 и 1818 соответственно.

При проведении сравнительной оценки иммуногенной активности экспериментальной вакцины против инфекционного ринита кур, включающей антигены штаммов № 1116, 5111 и 1818, с двумя коммерческими препаратами установлено, что вакцина производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» показала уровень защиты птиц при заражении гомологичными штаммами *A. paragallinarum* не менее $90,0 \pm 11,3\%$, а коммерческие биопрепараты – $46,6 \pm 13,1\%$ и $53,3 \pm 17,3\%$ соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 6–14 см. REFERENCES)

- Евграфова В. А., Потехин А. В. Вирулентность изолятов возбудителя инфекционного ринита кур. *Ветеринария сегодня*. 2017; 4 (23): 28–32. Режим доступа: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/329>.
- Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц. Под ред. Б. У. Кэлнека. М.: Аквариум; 2011. 1232 с.
- Потехин А. В., Евграфова В. А., Андрейчук Д. Б. Гемагглютинирующие и антигенные свойства изолятов *Avibacterium paragallinarum*, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь. *Ветеринария сегодня*. 2018; 4 (27): 31–38. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-31-38.
- Рождественская Т. Н., Кононенко Е. В., Емельянова С. А., Яковлев С. С., Теймуразов М. Г., Светоч Э. А. и др. Гемофилез птиц. *Птица и птицепродукты*. 2016; 4: 50–53. eLIBRARY ID: 26538824.
- Толстых Н. А., Юшков Ю. Г., Городов В. С., Леонов С. В. Гемофилез птиц: диагностика и профилактика. *Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий: материалы VI Международ. научно-практ. конф.* Горно-Алтайск; 2017: 274–277. eLIBRARY ID: 30313013.

REFERENCES

- Evgrafova V. A., Potekhin A. V. Virulence of infectious coryza causative agent isolates. *Veterinary Science Today*. 2017; 4 (23): 28–32. Available at: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/329>. (in Russian)
- Diseases of backyard and commercial poultry. Ed. by of B. U. Kelneck, M.: Aquarium; 2011. 1232 p. (in Russian)
- Potehin A. V., Yevgrafova V. A., Andreychuk D. B. Hemagglutination and antigenic properties of *Avibacterium paragallinarum* isolates recovered in the Russian Federation and Republic of Belarus. *Veterinary Science Today*. 2018; 4 (27): 31–38. DOI: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-31-38.
- Rozhdestvenskaya T. N., Kononenko Ye. V., Yemelyanova S. A., Yakovlev S. S., Teimurazov M. G., Svetoch E. A., et al. Glasser's disease [Gemofilez

ptic]. *Poultry and Poultry Products*. 2016; 4: 50–53. eLIBRARY ID: 26538824. (in Russian)

5. Tolstich N. A., Ushcov U. G., Gorodov V. S., Leonov S. V. Infectious coryza: diagnosis and prevention. *Current problems of agriculture in mountainous areas [Aktual'nye problemy sel'skogo hozjajstva gornyh territorij]: materials of the VI International Scientific and Practical Conf. Gorno-Altaysk*; 2017: 274–277. eLIBRARY ID: 30313013. (in Russian)

6. Blackall P. J., Soriano-Vargas E. Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Diseases of Poultry*. Ed. by D. E. Swayne. 13th ed. Ames, IA, USA; 2013; Chap. 20: 859–873. DOI: 10.1002/9781119421481.ch20.

7. Blackall P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12 (4): 627–632. PMID: PMC88928.

8. Blackall P. J., Eaves L. E., Rogers D. J. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1185–1187. PMID: PMC267902.

9. Kume K., Sawata A., Nakai T., Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 17 (6): 958–964. PMID: PMC272783.

10. Yamaguchi T., Blackall P. J., Takigami S., Iritani Y., Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis.* 1991; 35 (4): 965–968. DOI: 10.2307/1591636.

11. Jacobs A. A., van den Berg K., Malo A. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathol.* 2003; 32 (3): 265–269. DOI: 10.1080/0307945031000097859.

12. Terzolo H. R., Sandoval V. E., Pondal F. G. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol.* 1997; 26 (2): 365–376. DOI: 10.1080/03079459708419219.

13. Morales-Erasto V., Posadas-Quintana J. de J., Fernández-Díaz M., Saravia L. E., Martínez-Castañeda J. S., Blackall P. J., Soriano-Vargas E. An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2014; 26 (2): 272–276. DOI: 10.1177/1040638714523612.

14. Soriano V. E., Longinos G. M., Fernández R. P., Velásquez Q. E., Ciprián C. A., Salazar-García F., Blackall P. J. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 2004; 48 (4): 886–889. DOI: 10.1637/1188-033104R1.

Поступила 14.06.2020

Принята в печать 28.07.2020

Received on 14.06.2020

Approved for publication on 28.07.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Фирсова Маргарита Сергеевна, аспирант, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Евграфова Валерия Андреевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий сектором лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Потехин Андрей Владимирович, кандидат ветеринарных наук, технический специалист Biokorm International, Испания.

Яшин Роман Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный эксперт информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Русалеев Владимир Сергеевич, доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Margarita S. Firsova, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Valeria A. Yevgrafova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Sector, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Andrey V. Potekhin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Technical Specialist, Biokorm International, Spain.

Roman V. Yashin, Candidate of Science (Biology), Head of Laboratory for Porcine and Horned Livestock Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Expert of the Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

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

DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-213-219
 УДК 619:615.9:636.085.19:543.9

Микотоксикологический мониторинг. Сообщение 3. Кормовая продукция от переработки зернового сырья*

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 микотоксикологического обследования производственных партий подсолнечного жмыха и шрота, кормовой продукции от переработки сои и пшеничных отрубей, полученных из перерабатывающих предприятий и животноводческих хозяйств страны за период с 2009 по 2019 г. Детектирование и измерение содержания фузариотоксинов, включающих Т-2 токсин, диацетоксисцирпенол, дезоксинваленол, зеараленон и фумонизины группы В, а также альтернариола, охратоксина А, цитринина, афлатоксина В₁, стеригматоцистина, циклопиазоновой кислоты, микофеноловой кислоты, эргоалкалоидов и эмодина проведено по аттестованной процедуре с использованием конкурентного иммуноферментного анализа. В ходе обобщения результатов установлена доминирующая роль альтернариола в контаминации подсолнечного жмыха и шрота, а также частая встречаемость Т-2 токсина, охратоксина А, цитринина, циклопиазоновой кислоты, стеригматоцистина, микофеноловой кислоты и эмодина. Для основных контаминантов отмечено смещение медиан и 90%-го процентиля в сторону меньших значений по отношению к средним и максимальным содержаниям, что указывало на возможность случаев их накопления за пределами типичного диапазона. Обобщение и результаты микотоксикологического исследования пшеничных отрубей и кормовой продукции от переработки соевых бобов по полному перечню из 14 показателей приводятся в этой работе впервые. Установлено, что спектр микотоксинов, способных участвовать в контаминации соевого шрота, жмыха и сои полножирной, достаточно широк, что согласуется с результатами изучения состава микобиоты семян этой культуры. В соевом шроте показана возможность накопления высоких концентраций микофеноловой кислоты – до уровня 1255 мкг/кг. В партиях пшеничных отрубей выявлены случаи загрязненности диацетоксисцирпенолом и частая встречаемость Т-2 токсина, эмодина и эргоалкалоидов. Исходные данные мониторинга, систематизированные и обобщенные в данной работе, представлены в электронном виде в разделе «Дополнительные материалы». Обсуждаются перспективы обследования кормовой продукции от переработки семян других маслических культур, а также зерна пшеницы и кукурузы.

Ключевые слова: подсолнечный шрот/жмых, соевый шрот/жмых, соя полножирная, пшеничные отруби, микотоксины, мониторинг, иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Кононенко Г. П., Буркин А. А., Зотова Е. В. Микотоксикологический мониторинг. Сообщение 3. Кормовая продукция от переработки зернового сырья. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 213–219. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-213-219.

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.

UDC 619:615.9:636.085.19:543.9

Mycotoxicological monitoring. Part 3. Feedstuffs from raw grain processing*

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 (ARRIVSHE – Branch of the FSFSI FSC ARRIEVM RAS), 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

* Сообщение 1 см. *Ветеринария сегодня*. 2020; 1 (32): 60–65. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65.

Сообщение 2 см. *Ветеринария сегодня*. 2020; 2 (33): 139–145. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145.

* Part 1: *Veterinary Science Today*. 2020; 1 (32): 60–65. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-60-65.

Part 2: *Veterinary Science Today*. 2020; 2 (33): 139–145. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145.

SUMMARY

The paper presents the results of mycotoxicological testing of the production batches of sunflower cake and meal, feedstuffs of soybean and wheat bran processing received from domestic processing establishments and livestock farms from 2009 to 2019. Detection and measurement of the content of fusariotoxins, including T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins of B group, as well as alternariol, ochratoxin A, citrinin, aflatoxin B₁, sterigmatocystin, cyclopiazonic acid, mycophenolic acid, ergot alkaloids and emodin was carried out by a competitive ELISA in accordance with certified procedure. The summarized results demonstrate the predominant role of alternariol in the contamination of sunflower cake and meal, as well as the frequent occurrence of T-2 toxin, ochratoxin A, citrinin, cyclopiazonic acid, sterigmatocystin, mycophenolic acid and emodin. For the main contaminants, a shift in the medians and 90% percentile towards the lower values of the average and maximum contents was observed, which indicates the possibility of their accumulation beyond the typical range. The summary and results of mycotoxicological study of wheat bran and feedstuffs of soybean processing for a complete list of 14 parameters are presented in this paper for the first time. It was found that the range of mycotoxins that can contaminate soybean meal, cake and full-fat soybean is quite wide, which is consistent with the results of the study of soybean seed mycobiota composition. It was demonstrated that soybean meal can accumulate high concentrations of mycophenolic acid – up to 1,255 µg/kg. As for the wheat bran batches, cases of contamination with diacetoxyscirpenol and the frequent occurrence of T-2 toxin, emodin and ergot alkaloids were detected. The initial monitoring data, systematized and summarized in this paper, are presented in electronic form in the section “Additional materials”. The prospects of testing of feedstuffs from processing other oilseeds, as well as from wheat and corn grain processing are discussed.

Key words: sunflower meal/cake, soybean meal/cake, full-fat soybean, wheat bran, mycotoxins, monitoring, enzyme-linked immunosorbent assay.

For citation: Kononenko G. P., Burkin A. A., Zotova Ye. V. Mycotoxicological monitoring. Part 3. Feedstuffs from raw grain processing. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 213–219. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-213-219.

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

Улучшение кормовой базы животноводства в России является важнейшей задачей сельскохозяйственной науки. Здоровье животных, их продуктивность, иммунобиологический статус, качество и безопасность продуктов животноводства во многом зависят от санитарного состояния кормов и их сбалансированности по питательным веществам. В комбинированных кормах отечественного производства макрокомпоненты, дополняющие зерновую часть, представлены главным образом жмыхом и шротом из семян подсолнечника и соевых бобов, в несколько меньшей степени – побочной продукцией мукомольно-крупяной и крахмалопаточной отраслей. Широкая сеть масложировых предприятий и развитые мукомольно-крупяная и крахмалопаточная отрасли полностью обеспечивают отечественное кормопроизводство подсолнечным жмыхом и шротом, зерновыми отрубями, а также всеми видами продукции от комплексной переработки зерна кукурузы. Поставки соевого шрота, жмыха и сои полножирной экструдированной традиционно происходят из основных регионов выращивания этой культуры в Южном и Дальневосточном федеральных округах и дополняются поступлением импортируемого сырья для удовлетворения текущих запросов рынка.

Первый этап оценки загрязненности микотоксинами этих видов комбикормового сырья был выполнен в лаборатории микотоксинологии ГНУ ВНИИВСГЭ в 2002–2009 гг. [1, 2]. В этот период были установлены частая встречаемость охратоксина А и цитринина в подсолнечном жмыхе и шроте до уровней 190 и 1020 мкг/кг; меньшая – Т-2 токсина, дезоксиниваленола, стеригматоцистина, циклопиазоновой кислоты; отсутствие зearаленона и диацетоксисцирпенола. Кроме того, была констатирована слабая контаминация

соевого шрота Т-2 токсином. Дезоксиниваленол и зearаленон обнаруживали редко и в малых количествах, охратоксин А и цитринин – в единичных пробах, а фузонизины группы В, афлатоксин В₁, диацетоксисцирпенол, стеригматоцистин и циклопиазоновую кислоту выявить не удалось. Тем не менее в отдельных партиях импортированного продукта уровни дезоксиниваленола превышали 2000 мкг/кг, а зearаленона – 200 мкг/кг. Ситуация с отходами мукомольных предприятий получила лишь выборочную ограниченную оценку. Недавно особенности контаминации семян подсолнечника и кормовой продукции от их переработки стали предметом отдельного рассмотрения [3–5].

Цель данной работы – обобщение результатов обследования загрязненности микотоксинами производственных партий подсолнечного шрота, жмыха, кормовой продукции от переработки соевых бобов (шрот, жмых, соя полножирная) и пшеничных отрубей за период с 2009 по 2019 г. с представлением исходных данных в учетной электронной базе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были средние образцы от производственных партий подсолнечного шрота и жмыха, соевого шрота и жмыха, сои полножирной экструдированной и пшеничных отрубей, представленные специалистами ветеринарных служб, животноводческих и комбикормовых предприятий, компаний-сельхозпроизводителей, специализированных коммерческих организаций и владельцами крестьянских фермерских хозяйств в 2009–2019 гг. В выборке подсолнечных жмыхов и шротов, включающей 121 образец, документальное или ответственное подтверждение мест расположения перерабатывающих предприятий и хозяйств (Белгородская,

Волгоградская, Воронежская, Курская, Орловская, Ростовская, Саратовская, Тамбовская области, Краснодарский край, Приморский край, Республика Татарстан) имели 107, получены с Украины – 2, а для 12 данные отсутствовали либо их достоверность вызвала сомнения. Из 80 образцов соевого шрота, жмыха и переработанной сои 8 были получены по импорту, 6 – из Дальневосточного федерального округа (Амурская область, Приморский край). Какими-либо сведениями о происхождении остальной части продукции от переработки сои, а также 20 образцов кормовых отрубей мы не располагали.

В группу определяемых микотоксинов входили Т-2 токсин (Т-2), диацетоксисцирпенол (ДАС), дезоксиниваленол (ДОН), зеараленон (ЗЕН), фузонизины 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 основанной на жидкостной экстракции и непрямом конкурентном иммуоферментном анализе унифицированной методикой с официальным статусом [6]. 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: определяемые микотоксины, вид сырья, год обследования и место расположения предприятия или хозяйства.

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 подсолнечном шроте и жмыхе в целом по встречаемости доминировал АОЛ, продуцируемый грибами рода *Alternaria*, со средними значениями по выборкам 306 и 193 мкг/кг и возможностью высоких уровней накопления – до 1990 и 953 мкг/кг. Из группы фузариотоксинов только для Т-2 частота обнаружения была значительной – 21,4 и 37,3% при низких содержаниях с диапазонами 4–16 и 5–25 мкг/кг, лишь в единичных случаях удалось определить ДОН и ЗЕН, а ДАС и ФУМ отсутствовали (табл. 1, 2).

Токсины, продуцируемые грибами других таксонов, главным образом родов *Aspergillus* и *Penicillium*, за исключением АВ₁, были выявлены в обоих видах продукции. ЭА встречались одинаково редко в малых концентрациях, ОА, МФК и ЭМО – с примерно равной частотой, превышающей 50%, при этом частота контаминации ОА была выше, чем ЦИТ. По другим токсинам эти показатели варьировали в 1,5–2 раза в шроте и жмыхе. Ряды, выстроенные по средним значениям содержаний, совпадали и имели следующий вид: ЦИТ, ЦПК, МФК (75–97 мкг/кг) > ОА (14 и 16 мкг/кг) > СТЕ (7 мкг/кг). Медианы и пороговые концентрации для 90% значений (90%-й перцентиль) по всем контаминантам были

Таблица 1
Микотоксины в подсолнечном шроте (обобщенные данные 2009–2019 гг.)

Table 1
Mycotoxins in sunflower meal (summary data for 2009–2019)

Токсин	Встречаемость n^+/n (%)	Содержание, мкг/кг				
		диапазон		среднее значение	медиана	90%-й перцентиль
		мин.	макс.			
Т-2	15/70 (21,4)	4	16	9	9	13
ДОН	1/70 (1,4)	375	–	–	–	–
ДАС	0/34	–	–	–	–	–
ЗЕН	1/70 (1,4)	66	–	–	–	–
ФУМ	0/33	–	–	–	–	–
АОЛ	57/68 (83,8)	19	1990	306	104	839,2
ОА	48/70 (68,6)	4	93	14	10	25,6
ЦИТ	29/67 (43,3)	20	1020	87	44	106,2
АВ ₁	0/41	–	–	–	–	–
СТЕ	5/48 (10,4)	4	12	7	6	11,2
ЦПК	11/58 (19,0)	50	123	77	72	109
МФК	32/61 (52,5)	24	379	75	44	179,1
ЭА	1/43 (2,3)	11	–	–	–	–
ЭМО	29/54 (53,7)	15	278	72	52	159,2

n – число исследованных образцов (number of tested samples);

n^+ – число образцов, содержащих микотоксин (number of mycotoxin-containing samples).

Таблица 2
Микотоксины в подсолнечном жмыхе (обобщенные данные 2009–2019 гг.)

Table 2
Mycotoxins in sunflower meal (summary data for 2009–2019)

Токсин	Встречаемость n^+/n (%)	Содержание, мкг/кг				
		диапазон		среднее значение	медиана	90%-й процентиль
		мин.	макс.			
T-2	19/51 (37,3)	5	25	12	10	18,4
ДОН	0/51	–	–	–	–	–
ДАС	0/23	–	–	–	–	–
ЗЕН	0/51	–	–	–	–	–
ФУМ	0/16	–	–	–	–	–
АОЛ	41/50 (82,0)	20	953	193	79	536
ОА	32/51 (62,7)	4	62	16	9,5	36,8
ЦИТ	11/51 (21,6)	20	126	80	79	126
АВ ₁	0/29	–	–	–	–	–
СТЕ	10/39 (25,6)	4	11	7	5,5	9,2
ЦПК	21/39	50	142	81	71	120
МФК	9/44 (53,8)	20	334	97	63	222,8
ЭА	3/33 (9,1)	5	40	19	–	–
ЭМО	17/30 (56,7)	10	5000	369,5	59	229,4

n – число исследованных образцов (number of tested samples);

n^+ – число образцов, содержащих микотоксин (number of mycotoxin-containing samples).

ниже средних и максимальных значений, что указывало на несимметричность распределения количеств со случаями накопления, превышающими типичные для каждой выборки.

Таким образом, согласно полученным данным, подсолнечный шрот и жмых характеризуются множественным по составу сходным комплексом контаминантов, включающим АОЛ, Т-2, ОА, ЦИТ, ЦПК, СТЕ, МФК и ЭМО, частота встречаемости которых варьирует от 10,4 до 83,8%. Это дает все основания отнести оба вида вышеназванной продукции к сырью повышенного риска. Следует отметить, что другими авторами по результатам анализа, проведенного в 2008–2010 гг. по меньшей группе показателей, включающей Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ, ОА и АВ₁, на сопоставимых выборках подсолнечного шрота и жмыха из хозяйств и предприятий европейской части страны, было выявлено, что микотоксины, кроме отсутствующего ФУМ, крайне редки (выявляются с частотой от 1,9 до 2,7%) и шрот отличается от жмыха обширной, на порядок большей, загрязненностью АВ₁ (28,6%) [7]. Такие расхождения в оценке следует признать весьма неожиданными и трудно поддающимися каким-либо объяснениям.

Соевый шрот в отечественном кормопроизводстве относится к основным видам сырья от переработки соевых бобов, гораздо реже используются жмых и экструдированная полножирная соя. Обобщение и результаты исследования контаминации микотоксинами этой продукции по полному перечню из 14 по-

казателей (рис. 1) приводятся в этой работе впервые. Для соевого шрота на выборке из 49 образца полное подтверждение получил ранее установленный факт меньшей контаминации микотоксинами в сравнении с продукцией от переработки семян подсолнечника [1, 2]. Встречаемость, равную 10% и выше, имели только Т-2, ЭА и ЭМО, не были найдены ДАС, ОА и ЦИТ, остальные токсины хотя и детектировали, но реже и со средними содержаниями на уровне десятков мкг/кг. Только для МФК в отдельных образцах концентрации превышали этот порог и составляли 337 и 1255 мкг/кг (рис. 1А). Для соевого жмыха и сои полножирной по выборке, включающей 31 образец, наблюдались признаки сходства, такие как отсутствие ДАС, присутствие Т-2 и ЭМО с частотой более 10% и меньшая встречаемость ЗЕН и АОЛ, но при этом выявляли и отчетливые отличия (рис. 1Б). Среди них не только увеличенная частота контаминации Т-2, ДОН, ФУМ, ЭМО и интенсивности накопления ДОН, ФУМ, но также детектирование ОА и ЦИТ, хотя и в малых количествах, близких порогу обнаружения метода, и отсутствие ряда токсинов – АВ₁, СТЕ, ЦПК, МФК и ЭА.

Можно допустить, что наблюдаемые смещения в характере контаминации жмыха и полножирной сои в сравнении со шротом связаны с разным происхождением сырья, а также вызваны влиянием условий транспортировки и хранения партий. Столь же заметные колебания результатов, по-видимому, возможны и для шрота, также поступающего с географически

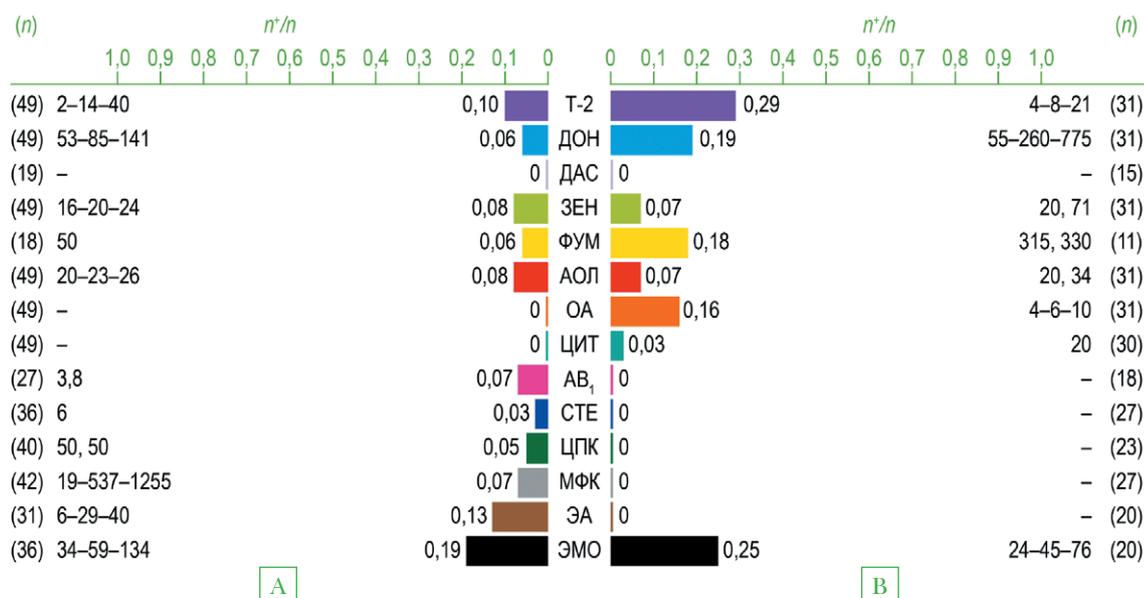


Рис. 1. Встречаемость (n⁺/n) и содержание микотоксинов (мкг/кг, мин. – среднее – макс.) в соевом шроте (А), соевом жмыхе и сое полножирной (В)

Fig. 1. Mycotoxin occurrence (n⁺/n) and content (µg/kg, min – average – max) in soybean meal (A), soybean cake and full-fat soybean (B)

удаленных территорий. Действительно, по данным работы Н. Страшилиной и соавт., для 166 образцов шрота, происхождение которых не уточнялось, загрязненность АВ₁ составила 100%, все анализированные фузариотоксины (Т-2, ЗЕН, ДОН и ФУМ) встречались с частотой от 20,9 до 28,6%, а ОА обнаружили в 2,2% случаев [7].

В целом спектр микотоксинов, способных участвовать в контаминации продуктов переработки сои, достаточно широк и вполне согласуется с результатами изучения микобиоты семян этой культуры. По данным

Словацкого сельскохозяйственного университета в городе Нитра (Slovak University of Agriculture in Nitra), в микобиоте кормовой сои, отобранной для анализа в агрофирмах этой страны, были широко представлены грибы *Aspergillus* и *Penicillium* и им сопутствовали представители родов *Cladosporium*, *Alternaria* и *Fusarium* [8]. Возможность бессимптомного заселения сои грибом *Fusarium verticillioides*, способным к биосинтезу ФУМ, показана недавно американскими исследователями [9]. Преобладание вида *Alternaria alternata*, продуцирующего АОЛ, и присутствие этого токсина показано в соевых бобах

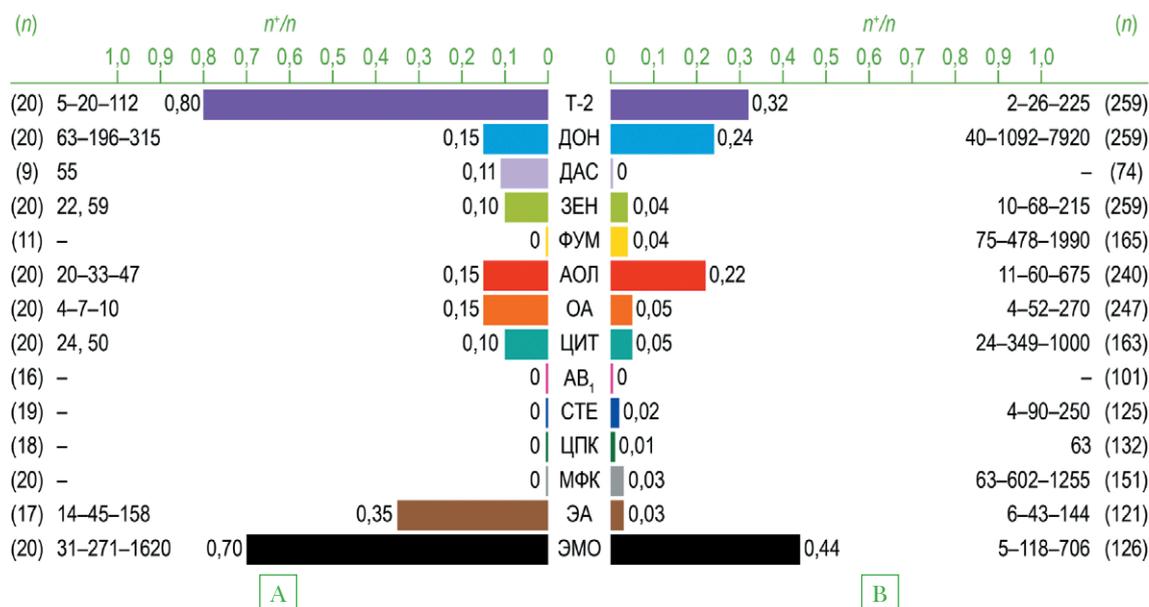


Рис. 2. Встречаемость (n⁺/n) и содержание микотоксинов (мкг/кг, мин. – среднее – макс.) в пшеничных отрубях (А) и в зерне пшеницы (В) (цит. по сообщению 2)

Fig. 2. Mycotoxin occurrence (n⁺/n) and content (µg/kg, min – average – max) in wheat bran (A) and wheat grain (B) (cit. for Part 2)

из Аргентины [10, 11]. В соевых отрубях, которые являются одним из важнейших компонентов кормов в Бразилии, выявлено частое присутствие грибов *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*), *Penicillium* (14,93%), а также *Fusarium* (3,25%) [12]. В семенах сои и соевой муке, импортированных в Армению из США, Канады, Испании и Греции, идентифицировано несколько потенциально токсигенных видов рода *Aspergillus* при редкой встречаемости *Penicillium cyclopium*, *P. lanosum* и *Fusarium moniliforme*, при этом в 6 из 17 образцов был найден АВ₁ (7–50 мкг/кг), в единичных – СТЕ (150 мкг/кг) и ЗЕН (2000 мкг/кг) [13]. Характер и интенсивность контаминации микотоксинами агропродукции из соевых бобов, несомненно, определяется сочетанием многих почвенно-климатических и экологических факторов.

Последние десятилетия отмечены расширением ареала возделывания сои в умеренные широты, и актуальность изучения ее контаминации остается весьма высокой, однако работы в этом направлении крайне малочисленны. Недавно в семенах из коллекционных и селекционных посадок сои в Беларуси идентифицирован вид *Alternaria alternata*, а также отдельные представители родов *Cladosporium* и *Fusarium* [14]. В России назрела необходимость комплексного микотоксикологического обследования сои не только в регионах ее традиционного выращивания, но и на активно осваиваемых территориях – в Белгородской, Ростовской областях, Алтайском и Ставропольском краях, Республике Адыгея, Республике Татарстан. Несомненную значимость имеет накопление в стране информации относительно других перспективных видов кормовой продукции от переработки семян масличных культур, в частности хлопчатника [15] и рапса. В 2018 г. при развернутом анализе образца рапсового жмыха, полученного из Краснодарского края, нами выявлены только ЦПК и ЭМО в малых количествах – 50 и 32 мкг/кг.

Анализ 20 образцов пшеничных отрубей показал, что характер распределения микотоксинов по частоте встречаемости Т-2, ЭМО > ДОН, АОЛ, ОА (рис. 2А) соответствует найденному для зерна пшеницы (рис. 2Б). ДАС, ЗЕН, ФУМ, АВ₁ и ЦПК детектировать не удалось, а ОА, ЦИТ, СТЕ, МФК, ЭА были определены в единичных образцах. Среди особенностей можно отметить заметно большее число случаев выявления Т-2, ЭА и обнаружение ДАС.

Несмотря на малую выборку, полученные сведения могут послужить основой для будущих научных проектов, направленных на изучение характера распределения микотоксинов во фракциях, отделяемых при выработке пшеничной муки и круп. Исходные данные мониторинга с указанием вида сырья, его происхождения и года поступления образцов представлены в электронном виде в разделе «Дополнительные материалы» по адресу <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-3-34-213-219>.

К сожалению, в нашей стране до сих пор остается неясной ситуация по загрязненности микотоксинами зерновой барды, которую получают сушкой и гранулированием отходов спиртового производства и все чаще используют для ввода в комбикорма. Тем не менее данные американских исследователей указывают на множественную и интенсивную контаминацию высушенного остатка ферментированного зерна с растворимыми веществами (distillers dried grains with solubles, DDGS) – ДОН, ЗЕН и ФУМ были выявлены в 70–90% образцов, при этом их концентрации дости-

жали значений 13 920, 8107 и 9042 мкг/кг, нередко также обнаруживали АВ₁ и Т-2 на уровнях до 89 и 226 мкг/кг соответственно [16]. В указанный период мы не имели возможности продолжить микотоксикологическое обследование глютенных кормов, весьма востребованных побочных продуктов крахмалопаточных комбинатов. В 2015 и 2016 гг. на анализ в лабораторию поступили два образца кукурузного глютена из Китайской Народной Республики, в одном из которых сочетанно присутствовали фузариотоксины Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ и СТЕ в количествах 145, 1860, 1080, 1260 и 11 мкг/кг соответственно, а в другом содержание ДОН и ЗЕН составляло 2320 и 2230 мкг/кг. Полученные сведения и предварительные результаты [2, 7], указывающие на интенсивную множественную контаминацию данного продукта, а также сочетанная загрязненность зерна кукурузы (см. сообщение 2) свидетельствуют о необходимости обязательного контроля кукурузного глютена по полному перечню показателей. Недостаточно внимания уделяется и другим видам продукции от комплексной переработки кукурузного зерна, все активнее применяемым в кормопроизводстве, таким как сухой кукурузный зародыш, а также жмых и шрот кукурузного зародыша. Тем не менее в 16 образцах жмыха кукурузного зародыша, полученных в 2009–2010 гг. из хозяйств европейской части страны, контаминация Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ, ОА и АВ₁ оказалась весьма значительной при частоте встречаемости от 43,8 до 75% [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе обширного мониторинга, проведенного в режиме ежегодного сбора данных за период с 2009 по 2019 г., получено подтверждение множественной контаминации микотоксинами подсолнечного шрота и подсолнечного жмыха с участием альтернариола, Т-2 токсина, охратоксина А, цитринина, циклопиазоновой кислоты, стеригматоцистина, микофеноловой кислоты и эмодаина при частоте встречаемости от 10,4 до 83,8%, что позволяет отнести их к группе повышенного риска. Для безопасного использования сырья на основе соевых бобов следует признать целесообразным внедрение региональных мониторинговых проектов на территориях интенсивного возделывания этой культуры и ее промышленной переработки, а также организацию регулярного обследования импортируемых партий жмыха и шрота в связи с возможностью обнаружения широкого спектра микотоксинов. Впервые описанные для пшеничных отрубей случаи выявления диацетоксисцирпенола и частая встречаемость Т-2 токсина, эмодаина и эргоалкалоидов указывают на необходимость введения обязательного входного контроля этой продукции на комбикормовых предприятиях.

Дополнительные материалы к этой статье (учетные формы с базой данных) можно найти по адресу <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-3-34-213-219>.

Additional materials to the paper (records forms with database) can be found at <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-3-34-213-219>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 8–12, 16 см. REFERENCES)

1. Буркин А. А., Кононенко Г. П. Микотоксины в кормовом сырье растительного происхождения. *Современная микология в России: тезисы докладов I съезда микологов России*. М.: Нац. акад. микол.; 2002; 263.

2. 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. eLIBRARY ID: 42888720.

3. Буркин А. А., Устюжанина М. И., Зотова Е. В., Кононенко Г. П. Причины контаминации производственных партий семян подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) микотоксинами. *Сельскохозяйственная биология*. 2018; 53 (5): 969–976. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.5.969rus.

4. Зотова Е. В., Кононенко Г. П., Буркин А. А. Микотоксины в подсолнечнике (*Helianthus annuus* L.): компонентный состав и распределение по растению. *Современная микология в России*. 2017; 7: 202–204. DOI: 10.14427/cmr.2017.vii.13.

5. Кононенко Г. П., Устюжанина М. И., Буркин А. А. Проблема безопасного использования подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) для пищевых и кормовых целей (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2018; 53 (3): 485–498. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.3.485rus.

6. ГОСТ 31653-2012 Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. М.: Стандартинформ; 2012. 11 с. Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200095352>.

7. Страшила Н., Головня Е., Филиппов М. Мониторинг микотоксинов в сырье и комбикорме. *Комбикорма*. 2010; 8: 63–66. eLIBRARY ID: 16544175.

13. Осипян Л. Л., Григорян К. М., Юсеф О. А. Загрязненность семян сои и соевой муки микромицетами и микотоксинами. *Микология и фитопатология*. 2002; 36 (1): 43–47. Режим доступа: https://www.binran.ru/files/journals/MiF/MiF_2002_36_1.pdf.

14. Суворова И. М., Поликсенова В. Д. Микобиота на культуре сои в Беларуси. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2009; 1: 109.

15. Кононенко Г. П., Пирязева Е. А., Зотова Е. В., Разоков Ш. И., Мирзоев Д. М. Микотоксины и токсинпродуцирующие микроскопические грибы в хлопковом жмыхе из Таджикистана. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2019; 1 (29): 31–38. DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201901005.

REFERENCES

1. Burkin A. A., Kononenko G. P. Mycotoxins in feed raw materials of plant origin [Mikotoksiny v kormovom syr'e rastitel'nogo proiskhozhdeniya]. *Current Mycology in Russia: 1st Congress of Russian Mycologists* (abstracts). M.: National Academy of Mycology; 2002; 263. (in Russian)

2. Kononenko G. P., Burkin A. A. Mycotoxicological control of raw feed materials and mixed feed. *Current aspects of veterinary pharmacology, toxicology and pharmacy: Proceedings of the Congress of Russian Pharmacologists and Toxicologists*. St-P.; 2011: 242–244. eLIBRARY ID: 42888720. (in Russian)

3. Burkin A. A., Ustyuzhanina M. I., Zotova E. V., Kononenko G. P. Reasons of contamination of production lots of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds by mycotoxins. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*. 2018; 53 (5): 969–976. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.5.969rus. (in Russian)

4. Zotova E. V., Kononenko G. P., Burkin A. A. Mycotoxins in sunflower (*Helianthus annuus* L.): component composition and distribution in different parts of the plant [Mikotoksiny v podsolnechnike (*Helianthus annuus* L.): komponentnyj sostav i raspredelenie po rasteniyu]. *Current Mycology in Russia*. 2017; 7: 202–204. DOI: 10.14427/cmr.2017.vii.13. (in Russian)

5. Kononenko G. P., Ustyuzhanina M. I., Burkin A. A. The problem of safe sunflower (*Helianthus annuus* L.) use for food and fodder purposes. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]*. 2018; 53 (3): 485–498. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.3.485rus. (in Russian)

6. GOST 31653-2012 Feed. Immunoenzyme method for mycotoxin detection. M.: Standardinform; 2012. 11 p. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200095352>. (in Russian)

7. Strashilina N., Golovnya E., Filippov M. Monitoring of mycotoxins in raw materials and compound feeds. [Monitoring mikotoksinov v syr'e i kombikorme]. *Compound Feeds*. 2010; 8: 63–66. eLIBRARY ID: 16544175. (in Russian)

8. Kacániová M. Feeding soybean colonization by microscopic fungi. *Trakya Univ. J. Sci.* 2003; 4 (2): 165–168. DIC: 86MKN512030104.

9. Kendra D. F. Asymptomatic colonization of soybean (*Glycine max*) by *Fusarium verticillioides*. *The World Mycotoxin forum – the fifth conference*. 17–18 November 2008. Netherlands; 119.

10. Broggi L. E., González H. H. L., Resnik S. L., Pacin A. *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Rios, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 2007; 24: 47–51. DOI: 10.1016/s1130-1406(07)70012-8.

11. Oviedo M. S., Barros G. G., Chulze S. N., Ramirez M. L. Natural occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in soya beans. *Mycotoxin Res.* 2012; 28: 169–174. DOI: 10.1007/s12550-012-0132-0.

12. Verdi S. R., Barbosa M., Norres V. S. Microbiological quality of soya bran used in animal nutrition. *Higiene Alimentar.* 2000; 14 (68/69): 101–106.

13. Osipyanyan L. L., Grigoryan K. M., Yusef O. A. Contamination of soya seeds and soya flour by micromycetes and mycotoxins. *Mycology and Phytopathology [Mikologiya i Fitopatologiya]* 2002; 36 (1): 43–47. Available at: https://www.binran.ru/files/journals/MiF/MiF_2002_36_1.pdf. (in Russian)

14. Suvorova I. M., Poliksenova V. D. Mycobiota of soybean in Belarus [Mikobiota na kul'ture soi v Belarusi]. *International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2009; 1: 109. (in Russian)

15. Kononenko G. P., Piryazeva E. A., Zotova E. V., Razokov Sh. I., Mirzoev D. M. Mycotoxins and toxin-producing microscopic fungi in cotton-seed cake from Tajikistan. *Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*. 2019; 1 (29): 31–38. DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201901005. (in Russian)

16. Griessler K., Hofstetter U. Worldwide occurrence of various mycotoxins in DDGS samples. *The World Mycotoxin forum – the fifth conference*. 17–18 November 2008, Netherland; 93.

Поступила 29.06.2020

Принята в печать 17.07.2020

Received on 29.06.2020

Approved for publication on 17.07.2020

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, ведущий 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), Leading 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.

Опосредованное определение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии при сравнении графиков второй производной для кривых ОТ-ПЦР-РВ

М. И. Доронин¹, Д. В. Михалишин², В. А. Стариков³, Д. А. Лозовой⁴, А. В. Борисов⁵

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

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

² ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

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

⁵ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

При репродукции в биологических системах вирус ящура формирует 4 варианта компонентов, три из которых не включают в себя РНК вируса. В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют количеству цельных вирионов, которые обладают важнейшими биологическими свойствами вируса ящура и являются основными компонентами, определяющими иммуногенность вакцинных препаратов. Сырье для вакцин на различных этапах технологического процесса исследуют с целью определения концентрации 146S компонента вируса ящура. Традиционным методом определения является количественный вариант реакции связывания комплемента. Для опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в вирусосодержащей суспензии в последние годы стали использовать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени. В статье представлен новый подход к опосредованному определению концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной кривых накопления сигнала флуоресценции относительно количества циклов реакции амплификации. Существование зависимости между концентрацией 146S компонента вируса ящура и максимальными экстремумами графиков второй производной кривой накопления флуоресцентного сигнала представлено в виде квадратичной функции $C_{146S\text{BR}} = 0,0111(C_p)^2 - 1,0157C_p + 20,446$ с высокой достоверностью аппроксимации ($R^2 = 0,993$). Предложенная модель позволяет количественно оценивать содержание 146S компонента в вирусосодержащем сырье для вакцины. Представленный способ позволяет исследовать большое количество образцов неинактивированного сырья для противоящурной вакцины за 4–5 ч. Основным преимуществом предлагаемого способа является возможность определения концентрации 146S компонента вируса ящура в суспензии, содержащей высокое количество балластного белка (более 7,00 мг/см³) и количество полных вирусных частиц от 0,01 до 5,00 мкг/см³.

Ключевые слова: вирионы вируса ящура, ОТ-ПЦР-РВ, пороговый цикл амплификации, график второй производной кривой амплификации.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Доронин М. И., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Лозовой Д. А., Борисов А. В. Опосредованное определение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии при сравнении графиков второй производной для кривых ОТ-ПЦР-РВ. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 220–227. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-220-227.

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.

Indirect determination of FMDV 146S component concentration in non-inactivated suspension by comparison of graphs of the second derivative for real-time RT-PCR curves

M. I. Doronin¹, D. V. Mikhailishin², V. A. Starikov³, D. A. Lozovoy⁴, A. V. Borisov⁵

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

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

² ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

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

⁵ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

SUMMARY

During reproduction in biological systems, FMD virus forms four variants of components, three of which do not include RNA of the virus. In the process of industrial production of FMD vaccines, special attention is paid to the number of whole virions, which have the most important biological properties of FMD virus and are the main components that determine the immunogenicity of vaccine preparations. Raw materials for vaccines at various stages of the technological process are tested for concentration of FMDV 146S component. The traditional method of determination is quantitative complement fixation test. In recent years, real-time RT-PCR has been used for indirect determination of FMDV 146S component concentration in a virus-containing suspension. The article presents a new approach to indirect determination of FMDV 146S component concentration in a non-inactivated suspension by comparing the maximum extreme points of the graphs of the second derivative of the fluorescence signal accumulation curves and the number of amplification reaction cycles. The dependence between FMDV 146S component concentration and the maximum extreme points of the graphs of the second derivative of the fluorescence signal accumulation curve is presented in the form of a square function: $C_{146S\text{ FMDV}} = 0.0111(C_p)^2 - 1.0157C_p + 20.446$ with a high accuracy of approximation ($R^2 = 0.993$). The proposed model allows to quantitatively estimate the content of 146S component in virus-containing vaccine raw materials. The presented method allows studying a large number of samples of non-inactivated raw materials for FMD vaccine in 4–5 hours. The main advantage of the proposed method is the capacity to determine the concentration of FMDV 146S component in a suspension with a high level of ballast proteins (more than 7.00 mg/cm³) and complete viral particles (from 0.01 to 5.00 µg/cm³).

Key words: FMDV virions, real-time RT-PCR, amplification threshold cycle, graph of second derivative of amplification curve.

Acknowledgements: The study was funded by the FGBl "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Starikov V. A., Lozovoy D. A., Borisov A. V. Indirect determination of FMDV 146S component concentration in non-inactivated suspension by comparison of graphs of the second derivative for real-time RT-PCR curves. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 220–227. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-220-227.

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, FGBl "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Во многих государствах ящур занимает первоочередное место в системе мер борьбы и профилактики вирусных болезней животных. Ящур является вирусным высококонтагиозным остропротекающим заболеванием диких и домашних парнокопытных и мозолоногих животных и представляет собой мировую проблему, которой уделяют особое внимание международные организации (ФАО, МЭБ) и ветеринарные службы многих стран [1, 2].

Геном вируса ящура представлен одноцепочечной позитивной РНК, состоящей приблизительно из 8500 н. о., окруженной икосаэдрическим капсидом, состоящим из 60 копий, каждая из которых представлена 4 структурными белками: VP₁ (1D-ген), VP₂ (1B-ген), VP₃ (1C-ген), VP₄ (1A-ген) [3–5].

В процессе репродукции в биологических системах вирус ящура формирует 4 варианта компонентов: 146S компонент (цельный вирион, полная частица), состоящий из одной цельной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида, каждая из которых представлена комплексом белков VP₁ (1D-ген), VP₂ (1B-ген), VP₃ (1C-ген), VP₄ (1A-ген); 75S частица («пустой» капсид), включающая в себя 60 копий полипептидов VP₀ (1AB-ген), VP₁ (1D-ген), VP₃ (1C-ген); 12S частица (капсомер), состоящая из структурных белков VP₁ (1D-ген), VP₂ (1B-ген), VP₃ (1C-ген); 3,8S субъединица, представленная неструктурным белком VP₀, 75S, 12S и 3,8S компоненты не включают в себя РНК вируса ящура [1, 3].

В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют количеству цельных вирионов, которые обладают важнейшими биологическими свойствами вируса ящура и являются основными компонентами, определяющими иммуногенность вакцинных препаратов [2, 3]. Поэтому сырье для вакцин на различных этапах технологического процесса исследуют с целью определения концентрации 146S компонента вируса ящура. Традиционно для этого применяют количественный вариант реакции связывания комплемента (РСК) и проводят оценку в соответствии с методическими рекомендациями [6]. В последние годы для опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной вирусосодержащей суспензии стали использовать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [1, 7–12]. Представленный метод является высокочувствительным, специфичным, экономичным и экспрессным, а также позволяет одновременно исследовать несколько десятков проб вирусосодержащего материала. Однако данная модификация имеет некоторые недостатки: при содержании в исследуемой пробе 146S компонента менее 0,1 мкг/см³ чувствительность реакции снижается; при наличии в образце большого количества белков и липопротеинов частицы сорбента сенсibiliзируются избытком балластных компонентов, что уменьшает возможность сорбирования РНК вируса и снижает чувствительность анализа; при

возможном попадании следовых количеств сорбента в реакционную смесь может возрастать фоновое значение флуоресценции и отмечаться искажение результатов анализа при определении коэффициента пропорциональности α между сигналом флуоресценции и количеством цельного вируса в пробе.

В связи с этим актуальной и перспективной задачей является совершенствование способа опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии на основе метода сравнения максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых реакции амплификации в режиме реального времени.

Цель исследования – разработка способа опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в вирусной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых реакции амплификации в режиме реального времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали культуральный вирус ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89. Репродукцию вируса осуществляли в суспензионной перевиваемой линии клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21. Использовали неинaktivированные суспензии вируса ящура с содержанием балластного белка более 7,00 мг/см³.

Реакция связывания комплемента (РСК). Для определения концентрации 146S компонента вируса ящура применяли количественный вариант РСК [6].

Определение концентрации 146S компонента. Оценку концентрации 146S компонента вируса ящура проводили методом ОТ-ПЦР-РВ с применением значений порогового цикла амплификации (Ct) в соответствии с требованиями, описанными ранее [7].

Сенсибилизация планшета поликлональными штаммоспецифическими антителами против вируса ящура. Шестилуночный планшет сенсибилизировали высокоочищенными штаммоспецифическими поликлональными антителами против вируса ящура в объеме 1,5 см³ суспензии с концентрацией иммуноглобулинов G 5,0 мкг/см³ при температуре 4 ± 2 °С в течение 18–20 ч. Открытые сайты связывания блокировали 1%-й суспензией желатина при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин и промывали лунки 1/15 М фосфатно-буферным раствором (ФБР) 5 раз.

Штаммоспецифическое связывание вируса ящура. В лунки с сенсибилизированными штаммоспецифическими антителами против вируса ящура вносили по 2,4 см³ образцов суспензий и инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин. Лунки отмывали от балластных компонентов 3 раза с использованием 1/15 М ФБР. Образовавшиеся иммунные комплексы респендировали в 1,0 см³ среды Игла МЕМ.

Выделение связанной иммунным комплексом РНК вирионов вируса ящура. Для выделения РНК 146S компонента вируса ящура за основу была взята методика P. Chomczynski [13, 14]. В результате процесса получали по 0,2 см³ 12-кратных экстрактов вирусной РНК.

Оценка степени чистоты элюатов РНК вируса ящура. Измерения спектральной поглощающей способности экстрактов РНК проводили при длинах волны в диапазоне 205–325 нм и температуре 22–25 °С. В выделенных экстрактах оценивали содержание остатков фосфоли-

пидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата (ГТЦ), карболовой кислоты, полипептидов и крупных взвешенных частиц, определяя значения оптической плотности (OD) при 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно [15]. Элюат РНК считали свободным от примесей белка и карболовой кислоты, если коэффициент экстинкции R_1 (OD_{262}/OD_{280}) находился в пределах 1,8–2,2 и оптимально составлял примерно 2,0. Более низкие значения R_1 указывали на наличие ДНК, белковых составляющих и остатков карболовой кислоты в элюате. Более высокие значения коэффициента R_1 свидетельствовали о деградации РНК и наличии свободных рибонуклеотидов. Экстракт нуклеиновой кислоты вируса ящура считали незагрязненным полисахаридами, если коэффициент экстинкции R_2 (OD_{262}/OD_{235}) приближен к значению 2,000. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие R_2 снижается на 0,002 [16]. Значения коэффициента R_2 больше 2,000 могут указывать на деградацию молекул РНК. Отсутствие взвеси крупных частиц в элюате подтверждается, если OD_{320} приближено к нулевому значению [15, 16]. При несоответствии требованиям чистоты повторно проводят этапы серологического связывания и выделения РНК вируса ящура из исходного материала.

Проведение ОТ-ПЦР-РВ для количественного определения 146S частиц вируса ящура. Для постановки реакции в качестве гомологичных 3D-гену вируса ящура олигонуклеотидов использовали Forward-3D-FMDV-праймер (5'-ACT-GGT-TTT-ACA-AAC-CTG-TGA-GGT-3'), Reverse-3D-FMDV-праймер (5'-GCG-AGT-CCT-GCC-ACG-GAG-TTG-GTT-3') и 3D-FMDV-ROX/ВНҚ2-зонд (5'-ROX-TCC-TTT-GCA-CGC-CGT-GGG-ACG-3') в концентрации 15 пМ на реакцию. Концентрация каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов составляла по 0,2 мМ. В качестве основы использовали DreamTaq буфер (10x), хлорид магния и диметилсульфооксид в количествах 4 мМ и 3% от объема ОТ-ПЦР-РВ-смеси соответственно. В качестве катализаторов обратной транскрипции и реакции амплификации применяли MMLV-обратную транскриптазу (10 ед.) и *Thermus aquaticus* DNA-полимеразу (1 ед.). Температурные и временные показатели ОТ-ПЦР-РВ проводили в соответствии с требованиями, описанными ранее [7].

Контроль при тестировании разработанного способа. В качестве положительного контроля применяли неинaktivированную суспензию культурального вируса ящура с количеством вирионов 1,00 мкг/см³. Отрицательным контролем служила не инфицированная вирусом ящура суспензия клеток ВНК-21 с концентрацией 2,5–3,0 млн/см³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования получали контрольную панель готовых разведений стандарта, в качестве которого использовали неинaktivированную суспензию культурального вируса ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89 с концентрациями 146S компонента вируса: 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00 мкг/см³. Далее суспензию, содержащую вирус ящура, вносили в планшеты, сенсибилизированные антителами против вируса ящура данного штамма, и затем из полученных комплексов «вирион вируса ящура – штаммоспецифические антитела» выделяли вирусную РНК. В результате получали 12-кратные экстракты вирусной РНК каждого разведения стандарта и проводили оценку степени их чистоты с помощью

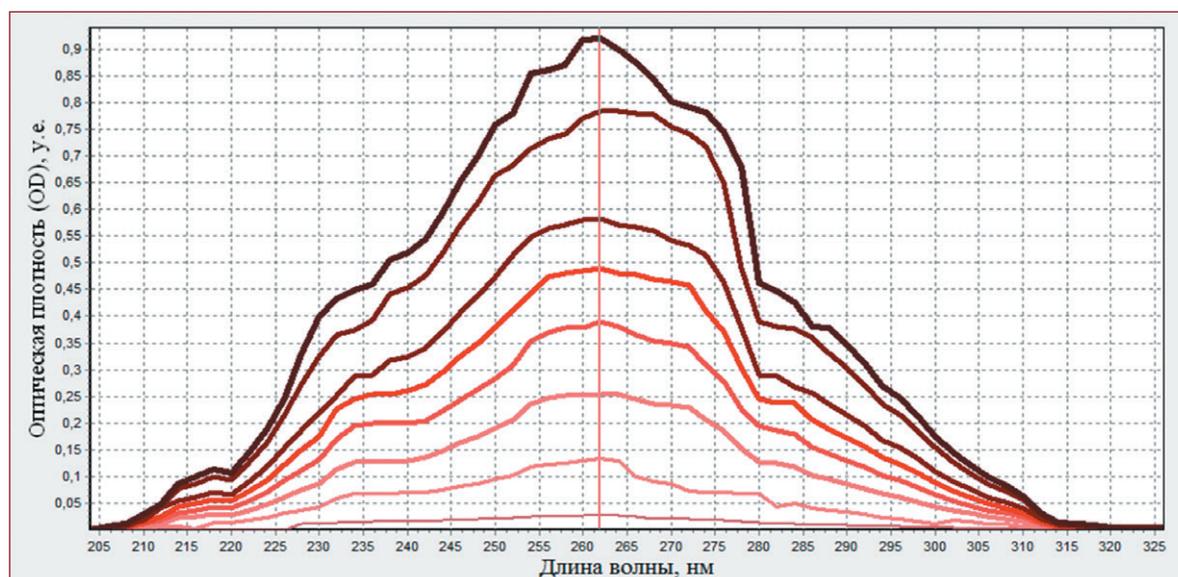


Рис. 1. Спектрограммы разведений элюатов РНК вируса ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89. Снизу вверх отражены графики для разведений экстрактов, соответствующих следующим концентрациям вирионов: 0,01; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг/см³

Fig. 1. Spectrograms of diluted eluates of FMDV RNA (Asia-1/Shamir Israel 3/89 strain). From bottom to top see graphs for diluted extracts corresponding to the following concentrations of virions: 0.01; 0.10; 0.50; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 µg/cm³

спектрального анализа в излучении ультрафиолетового света. Запись спектра поглощения РНК разведений стандарта при длинах волн от 205 до 325 нм представлена на рисунке 1.

По результатам анализа контрольных образцов в указанных выше разведениях выявили, что значения $OD_{205-259}$ и $OD_{263-325}$ не превышали $OD_{260-262}$, что является признаком высокой степени чистоты полученных элюатов РНК ($n = 3$). Из данных спектрального исследования стандартов, отраженных на рисунке 1, отмечали отсутствие выраженных пиков на графиках при длинах волн 205, 235, 270, 280 и 320 нм, что свидетельствовало о практически полном отсутствии загрязнения экстрактов РНК примесями фосфолипидов, полисахаридов и остатков ГТЦ, карболовой кислоты, полипептидов и крупных конгломератов соответственно. Значения коэффициента экстинкции R_1 для стандартов приближены к норме 2,000 (R_1 составлял 1,995–1,999), что подтверждало отсутствие ДНК и наличие лишь следовых количеств примесей белка и остатков карболовой кислоты. Деградация нуклеиновой кислоты и наличия свободных нуклеотидов в элюатах не наблюдали, так как R_2 не превышал 2,000. Экстракты вирусной РНК разведений стандарта не были загрязнены полисахаридами и ГТЦ, поскольку значения коэффициента экстинкции R_2 приближены к норме 2,000 и соответствовали 2,000–2,001. Учитывая, что при замещении 1% РНК на углеводы значение R_2 уменьшается на 0,002 [16], в полученных экстрактах наличие полисахаридных примесей не выявлено. Степень разрушения РНК в экстрактах составляла не более 0,5% ($(2,001 - 2,000) / 0,002$), что является допустимым. Таким образом, экстракты РНК вируса ящура, выделенные из разведений стандарта и используемые для дальнейших исследований, характеризовались высокой степенью чистоты.

На следующем этапе работы проводили ОТ-ПЦР-РВ в соответствии с рекомендациями, отраженными выше.

Анализ был основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности *Thermus aquaticus* ДНК-полимеразы. В отсутствие мишени флуорофор ROX и гаситель флуоресценции BHQ2 в составе 3D-FMDV-зонда сближены за счет максимального использования водородных связей между атомами Н, О и N олигонуклеотидов. Благодаря механизму флуоресцентно-резонансного переноса энергии свечение подавлено. За счет 5'-экзонуклеазной активности *Thermus aquaticus* ДНК-полимеразы после отжига Forward-3D-FMDV-, Reverse-3D-FMDV-праймеров и 3D-FMDV-ROX/BHQ2-зонда происходило разрушение гибридного зонда и ампликона, наблюдали их пространственное разделение, что приводило к росту детектируемого сигнала. Увеличение уровня флуоресценции (Fl) было пропорционально количеству образующихся продуктов реакции. Мониторинг сигнала в течение 40 циклов (С) ПЦР в режиме реального времени позволил построить кинетические кривые флуоресценции, которые заданы функциями вида $Fl = f(C)$.

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Rotor-Gene FRT-Manager, которое позволяет строить графики накопления флуоресцентного сигнала в режиме реального времени на протяжении заданного количества циклов амплификации.

Применяя технологии компьютерной программы Maxima (или аналога), проводили построение графиков первой и второй производной для полученных элюатов РНК вируса ящура каждого разведения стандарта с известными концентрациями 146S компонента вируса и рассчитывали средние значения максимальных экстремумов (C_p) графиков второй производной $Fl = f(C_p)$ с проекцией на ось абсцисс «О-циклы».

Величина C_p является важной характеристикой реакции, прямо пропорциональна количеству копий исходной матрицы РНК и, соответственно, концентрации

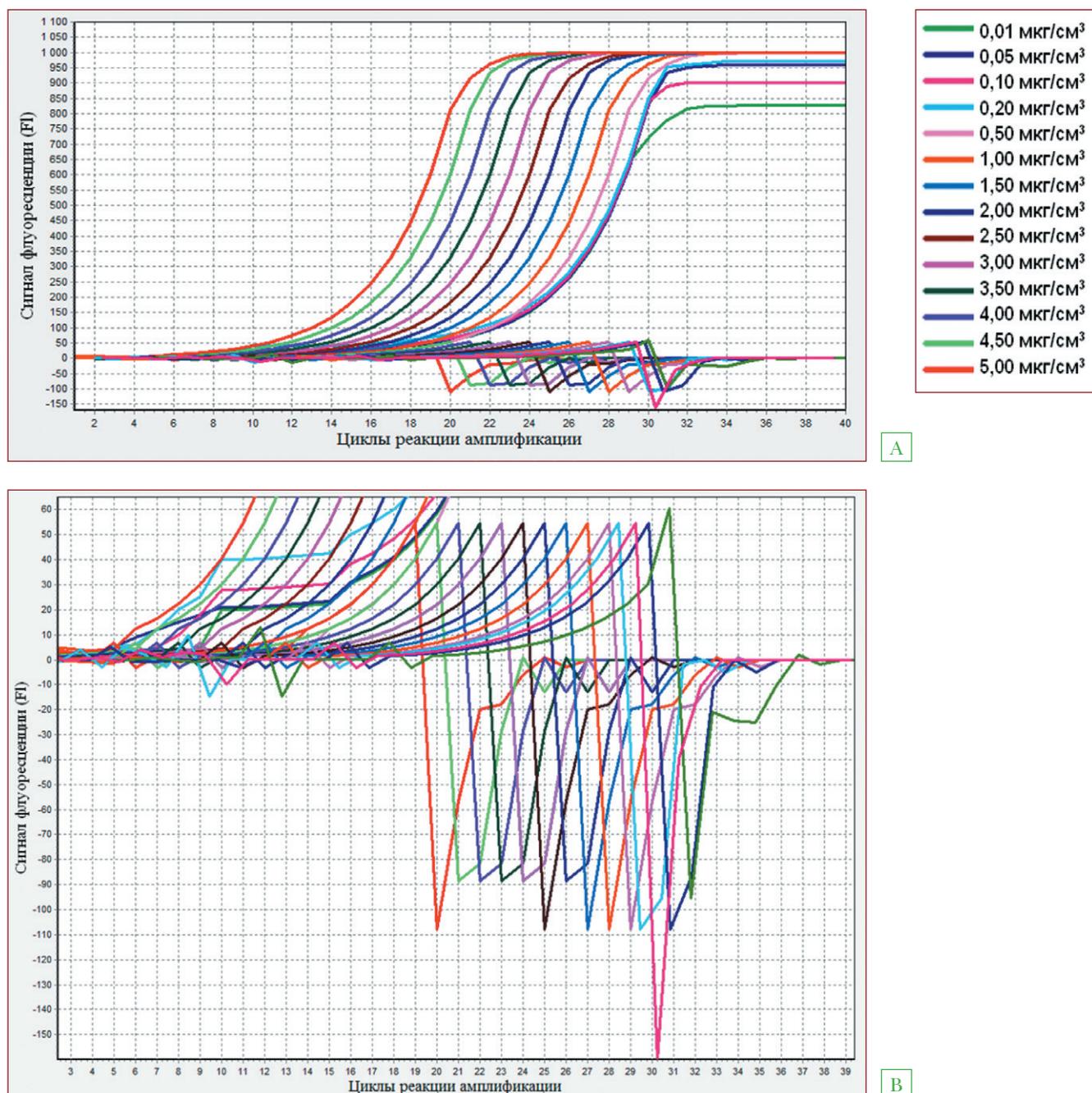


Рис. 2. Средние значения критических точек C_p , рассчитанные с помощью второй производной для графиков реакции амплификации в реальном времени при анализе РНК стандарта вируса ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89 с концентрациями 146S компонента 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00 мкг/см³ ($n = 3$) (А – графики накопления флуоресцентного сигнала, первой и второй производных; В – графики второй производной для кривых реакции амплификации)

Fig. 2. Mean values of critical points C_p calculated with the second derivative for real-time amplification reaction graphs during analysis of RNA of standard FMD virus, Asia-1/Shamir Israel 3/89 strain, with the following concentrations of 146S component: 0.01; 0.05; 0.10; 0.20; 0.50; 1.00; 1.50; 2.00; 2.50; 3.00; 3.50; 4.00; 4.50; 5.00 mcg/cm³ ($n = 3$) (A – graphs of accumulation of fluorescent signal, first and second derivatives; B – graphs of second derivatives for amplification reaction curves)

146S компонента вируса ящура, поскольку каждая такая частица содержит по одной молекуле вирусной РНК [3, 17, 18]. Учитывая, что вторая производная функции $f(C_p)$ ($f''(C_p)$) непрерывна в некоторых окрестностях точки $C_p = C_{p1}$ и задана на отрезке циклов амплификации от 0 до 40, существует определенный участок

около точки C_p , для которого во всех координатах на оси $O-C_p$ вторая производная функции $f(C_p)$ будет отрицательна. Поскольку $f''(C_p)$ является первой производной от функции $f'(C_p)$, то из условия $(f'(C_p))' < 0$ следует, что $f'(C_p)$ на некотором малом отрезке, содержащем точку $C_p = C_{p1}$, будет убывающей. Учитывая, что $f'(C_p) = 0$,

Таблица

Зависимость концентрации 146S компонента вируса ящура и значений максимальных экстремумов кривых реакции амплификации в реальном времени, определенных с помощью второй производной ($n = 3$)

Table

Relationship between concentration of FMDV 146S component and values of maximum extreme points of real-time amplification reaction curves determined with the second derivative ($n = 3$)

Тип образца	Концентрация 146S компонента вируса ящура, мкг/см ³	Определение концентрации 146S компонента вируса ящура в ОТ-ПЦР-РВ							
		по критической точке C_p (crossing point) (предложенный способ)					по пороговому циклу амплификации C_t (threshold cycle) (прототип)		
		C_{p1}	C_{p2}	C_{p3}	$C_{p\text{ср}}$	$C_{\text{вирионов}}$, мкг/см ³	$C_{t\text{ср}}$	$C_{\text{вирионов}}$, мкг/см ³	
							на 12× элюат	на 1× элюат	
Стандарт с известными концентрациями 146S компонента вируса ящура (по данным РСК)	0,01	29,85	29,92	29,81	29,86 ± 0,06	0,010 ± 0,003	29,19 ± 0,08	0,058 ± 0,069	0,005 ± 0,005
	0,05	29,82	29,78	29,71	29,77 ± 0,06	0,050 ± 0,010	29,12 ± 0,07	0,304 ± 0,098	0,025 ± 0,009
	0,10	29,59	29,63	29,61	29,61 ± 0,04	0,103 ± 0,020	29,01 ± 0,06	0,660 ± 0,083	0,055 ± 0,038
	0,20	23,34	29,31	29,35	29,33 ± 0,02	0,204 ± 0,030	28,78 ± 0,06	1,440 ± 0,038	0,120 ± 0,050
	0,50	28,53	28,51	28,56	28,53 ± 0,03	0,503 ± 0,041	27,74 ± 0,05	4,985 ± 0,024	0,415 ± 0,050
	1,00	27,21	27,19	27,28	27,23 ± 0,05	1,019 ± 0,032	25,93 ± 0,05	11,160 ± 0,013	0,931 ± 0,052
	1,50	26,02	26,05	26,08	26,05 ± 0,03	1,520 ± 0,031	24,28 ± 0,04	16,741 ± 0,015	1,395 ± 0,048
	2,00	25,03	25,01	25,00	25,01 ± 0,02	1,990 ± 0,030	22,57 ± 0,04	22,560 ± 0,011	1,882 ± 0,051
	2,50	23,94	23,88	23,92	23,91 ± 0,03	2,506 ± 0,028	20,83 ± 0,03	28,503 ± 0,014	2,375 ± 0,039
	3,00	22,99	22,95	23,00	22,98 ± 0,03	2,970 ± 0,027	19,26 ± 0,03	33,840 ± 0,015	2,820 ± 0,045
	3,50	22,01	22,04	21,99	22,01 ± 0,03	3,470 ± 0,034	17,72 ± 0,05	39,060 ± 0,012	3,255 ± 0,044
	4,00	20,99	20,98	21,04	21,00 ± 0,03	4,010 ± 0,030	16,22 ± 0,05	44,160 ± 0,014	3,682 ± 0,038
	4,50	20,10	20,07	20,05	20,07 ± 0,03	4,530 ± 0,031	14,60 ± 0,05	49,684 ± 0,019	4,144 ± 0,061
5,00	19,29	19,21	19,26	19,25 ± 0,04	5,007 ± 0,033	13,15 ± 0,05	54,601 ± 0,017	4,556 ± 0,055	
Отрицательный контроль	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

p -критерий: для C_p образцов с концентрациями 0,01–0,10 мкг/см³ составляет менее 0,010, с концентрациями 0,10–5,00 мкг/см³ – менее 0,005 (для разработанного метода); для C_t образцов с концентрациями 0,01–0,10 мкг/см³ – менее 0,020, с концентрациями 0,10–0,20 мкг/см³ – менее 0,10 мкг/см³ и с концентрациями 0,50–5,00 мкг/см³ – менее 0,005 (для прототипа). Для расчета концентрации 146S частиц в 12-кратном образце методом C_t (первоначальный способ) применяли формулу: $C_{146S} = -3,401(C_t) + 99,333$, для расчета содержания вирионов в однократном образце полученное значение делили на 12.

p -criteria: for C_p samples with concentrations of 0.01–0.10 µg/cm³ is less than 0.010, with concentrations of 0.10–5.00 µg/cm³ – less than 0.005 (for the developed method); for C_t samples with concentrations of 0.01–0.10 µg/cm³ – less than 0.020, with concentrations of 0.10–0.20 µg/cm³ – less than 0.10 µg/cm³, and with concentrations of 0.50–5.00 µg/cm³ – less than 0.005 (for the prototype). To calculate the concentration of 146S particles in 12-fold sample using C_t method (initial method) the following formula was used: $C_{146S} = -3.401(C_t) + 99.333$, to evaluate the content of virions in an one-fold sample the obtained value was divided by 12.

на участке при $C_p < C_{p1}$ первая производная функции $f(C_p) > 0$, а при $C_p > C_{p1}$ получаем, что $f'(C_p) < 0$. Иными словами, первая производная функции $f(C_p)$ при переходе через точку $C_p = C_{p1}$ изменяет знак с плюса на минус, следовательно, в точке C_{p1} функция, отражающая процесс накопления флуоресцентного сигнала, имеет максимальный экстремум [17]. Таким образом, если график реакции амплификации в режиме реального времени представлен функцией $Fl = f(C_p)$, $f'(C_p) = 0$ и $f''(C_p) < 0$, то при условии, что $C_p = C_{p1}$ полученная функция имеет максимум в точке с аргументом C_{p1} , значение которой учитывают для установления зависимости между концентрацией 146S компонента вируса ящура и величиной C_p .

Преимущество использования второй производной в данном случае заключается в том, что при умножении

функции кривой амплификации $Fl = f(C_p)$ на любые множители, в том числе на коэффициент пропорциональности a [8, 14], положение максимумов производных не меняется. Максимальный экстремум второй производной находится внутри экспоненциального участка графика накопления флуоресценции, то есть в зоне экспоненты, при анализе которой эффективность реакции амплификации не изменяется [17].

Графики первой и второй производной для полученных элюатов РНК вируса ящура каждого разведения стандарта с известными концентрациями вирионов вируса ящура представлены на рисунке 2.

Результаты эксперимента по представлению системы параллельной оценки величины максимальных экстремумов графиков второй производной для

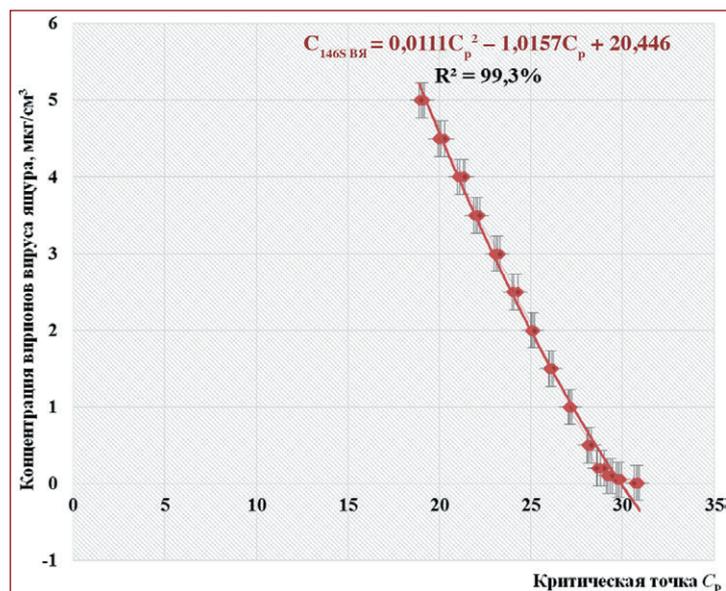


Рис. 3. Зависимость критической точки C_p детектируемой с помощью второй производной для кривой амплификации в режиме реального времени, от концентрации 146S компонента вируса ящура (с указанием стандартной погрешности) ($n = 3$)

Fig. 3. Relationship between critical point C_p detected with the second derivative for real-time amplification curve and concentration of FMDV 146S component (standard error specified) ($n = 3$)

кривых реакции амплификации в режиме реального времени (C_p) и концентрации 146S компонента вируса ящура ($C_{146S\text{ BV}}$) в контрольных образцах представлены в таблице, из которой следует, что значения C_p для всех разведений стандарта культурального вируса ящура с концентрациями 146S компонента от 0,01 до 5,00 мкг/см³ находятся в диапазоне от 29,86 ± 0,06 до 19,25 ± 0,04 соответственно. При исследовании отрицательного контроля накопления флуоресцентного сигнала не наблюдалось, что подтверждало отсутствие вируса ящура в данном образце. В представленных исследованиях p -уровень значимости меньше 0,010 для контрольных образцов стандарта с концентрациями 146S компонента вируса ящура от 0,01 до 0,10 мкг/см³ и $p < 0,005$ – от 0,20 до 5,00 мкг/см³.

Зависимость концентрации 146S компонента вируса ящура и значений максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых накопления флуоресцентного сигнала представлена на рисунке 3 и отражена в виде квадратичной функции $C_{146S\text{ BV}} = 0,0111(C_p)^2 - 1,0157C_p + 20,446$ с высокой достоверностью аппроксимации ($R^2 = 99,3\%$). Модель разработана для анализа полученных данным способом 12-кратных элюатов РНК вируса ящура. Таким образом, выявлено существование зависимости концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины и максимального экстремума графика второй производной для кривой реакции амплификации в режиме реального времени.

Контрольные образцы параллельно исследовали в РСК и классическим методом ОТ-ПЦР-РВ с определением значения порогового цикла амплификации (C_t) и расчетом концентрации 146S компонента ($n = 3$) [7]. Следует отметить, что подготовка элюатов и проведение ОТ-ПЦР-РВ для разработанного способа и прото-

типа различаются, в связи с этим значения пороговых циклов амплификации для получаемых графиков накопления флуоресцентного сигнала одной и той же пробы будут иметь отличия.

Полученные данные отражены в таблице, из которой следует, что степень различий результатов анализа контролей разработанным способом и истинными значениями положительных стандартов составляет 0,00–2,91%. Различия в определении концентрации 146S компонента вируса ящура положительных контролей с содержанием балластного белка более 7,00 мкг/см³ первоначальным способом по сравнению с ожидаемыми значениями для образцов с концентрациями 146S компонента от 0,01 до 0,10 мкг/см³ составили 45–52%, от 0,01 до 0,10 мкг/см³ – 17–45%, с содержанием полных вирусных частиц от 0,50 до 5,00 мкг/см³ – 5–17%. В отрицательном контроле вирус ящура не был выявлен ни одним из представленных способов. Таким образом, разработанный способ опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых реакции амплификации в режиме реального времени позволяет в течение 4–5 ч с высокой степенью достоверности исследовать вирусосодержащий материал с концентрациями 146S компонента от 0,01 до 5,00 мкг/см³ с наличием в пробах более 7,00 мкг/см³ балластного белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к опосредованному определению концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной кривых накопления сигнала флуоресценции относительно количества циклов реакции амплификации.

Предложенный способ позволяет: 1) повысить специфичность анализа проб за счет штаммоспецифического связывания вирионов вируса ящура; 2) исключить возможность увеличения фоновых значений флуоресценции за счет использования методики P. Chomczynski разделения фракций проб; 3) повысить достоверность проводимого анализа благодаря установлению зависимости между значениями концентрации 146S компонента вируса ящура ($C_{146S\text{ BV}}$) и максимальными экстремумами графиков второй производной для кривых реакции амплификации (C_p).

Определено существование зависимости между количествами 146S частиц вируса ящура и максимальными экстремумами графиков второй производной кривой накопления флуоресцентного сигнала в виде квадратичной функции $C_{146S\text{ BV}} = 0,0111(C_p)^2 - 1,0157C_p + 20,446$ с высокой достоверностью аппроксимации ($R^2 = 0,993$). Предложенная модель позволяет количественно оценивать содержание вирионов вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины за 4–5 ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

(п. п. 1, 2, 4, 5, 8–18 см. REFERENCES)

- Пономарев А. П., Узюмов В. Л. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. Владимир: Фолиант; 2006. 250 с.
- Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. Суздаль. 1994: 92 с.
- Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Щербаков А. В., Тимина А. М., Шишкова А. А. и др. Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в вирусосодержащем сырье для вак-

цины с применением метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Патент № 2619878 Российской Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2016140460. Заявл. 14.10.2016. Оpubл. 18.05.2017. Бюл. № 14.

REFERENCES

- Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases. In: *Diseases of Swine*. Ed by B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Alaire, D. J. Taylor. 9th ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional; 2006: 517–536.
- Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018; Чап. 3.1.8: 433–464. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.
- Ponomarev A. P., Uzyumov V. L. Foot-and-mouth disease virus: structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svojstva]. Vladimir: Foliant; 2006: 250 p. (in Russian)
- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. L., Garland A. J. M. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003; 129 (1): 1–36. DOI: 10.1016/S0021-9975(03)00041-0.
- Food-and-Mouth Disease Virus. Taxonomy. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=FMDV>.
- Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical analysis of viral proteins [Kachestvennyy i kolichestvennyy immunohimicheskiy analiz virusnyh belkov]. Suzdal; 1994: 92 p. (in Russian)
- Lozovoy D. A., Mikhailishin D. V., Doronin M. I., Shcherbakov A. V., Timina A. M., Shishkova A. A., et al. Method for foot and mouth disease virus 146S-component concentration determination in virus-containing raw material for vaccine using reverse transcription-polymerase chain reaction method in real time mode. Patent No. 2619878 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). FGBl "ARRIAH". No. 2016140460. Date of filing: 14.10.2016. Date of publication: 18.05.2017. Bull. No. 14. (in Russian)
- Liu W., Saint D. A. Validation of a quantitative method for real-time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294 (2): 347–353. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00478-3.
- Peirson S. N., Butler J. M., Foster R. G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (14):e73. DOI: 10.1093/nar/gng073.
- Shaw A. E., Reid S. M., Ebert K., Hutchings G. H., Ferris N. P., King D. P. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods.* 2007; 143 (1): 81–85. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.
- Scherbakov A., Lomakina N., Drygin V., Gusev A. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis. *Veterinary Quarterly.* 1998; 20 (2): 32–34. DOI: 10.1080/01652176.1998.9694962.
- Wernike K., Beer M., Hoffmann B. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus, influenza A virus and classical swine fever virus by high-speed real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2013; 193 (1): 50–54. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.05.005.
- Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
- Peirson S. N., Butler J. N. RNA extraction from mammalian tissues. In: *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology™*. Eds E. Rosato. 2007; 362: 315–327. DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1_22.
- The analysis of DNA or RNA using its wavelengths: 230 nm, 260 nm, 280 nm. Available at: <https://www.webcitation.org/6ATzE7YQz?url=http://biotechnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm> (date of access: 02.06.2019).
- Glase J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques.* 1995; 18 (1): 62–63. PMID: 7702855.
- Rutledge R. G., Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 2004; 31 (16):e93. DOI: 10.1093/nar/gng093.
- Wittwer C. T., Gutekunst M., Lohmann S. Method for quantification of an analyte. Patent No. 6,503,720 B2 United States, Int. Cl. C12Q 1/68, C12P 19/34; C07H 21/04; C07H 21/00. Roche Diagnostics GmbH (DE); University of Utah Research Foundation, Salt Lake City, UT (US). Appl. No. 09/789,170. Filed: Feb. 20, 2001. Prior publication data: Mar. 7, 2002. Date of patent: Jan. 7, 2003.

Поступила 10.02.2020

Принята в печать 07.04.2020

Received on 10.02.2020

Approved for publication on 07.04.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший 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.

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

Лозовой Дмитрий Анатольевич, доктор ветеринарных наук, доцент, г. Владимир, Россия.

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

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

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

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

Dmitry A. Lozovoy, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Vladimir, Russia.

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

Исследование лечебного воздействия вод термальных источников провинции Афьон на экспериментально индуцированную жировую дистрофию печени у мышей

Bülent Elitok¹, Ibrahim Kışlalioğlu², Yavuz Ulusoy³, Bahadır Kiliç⁴

¹ Университет Афьон Коджатепе, г. Афьонкарахисар, Турция

² Министерство сельского и лесного хозяйства, управление сельского хозяйства провинции, г. Испарта, Турция

^{3,4} Центральный научно-исследовательский институт ветеринарного контроля, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Анкара, Турция

¹ ORCID: 0000-0003-3336-4479, e-mail: elitok1969@hotmail.com

³ e-mail: yavuz.ulusoy@tarim.gov.tr

⁴ e-mail: bahadir.kilinc@tarim.gov.tr

РЕЗЮМЕ

В связи с возрастающим количеством случаев развития алкогольной жировой дистрофии печени в мире актуальной задачей является разработка методов лечения этого заболевания. Из литературных данных известно, что минеральная вода из термальных источников оказывает благотворное влияние на клетки печени. В связи с этим было проведено исследование по оценке эффективности применения термальной воды из источника Süreyua I (провинция Афьонкарахисар) при лечении жировой дистрофии печени. Для эксперимента были отобраны 50 мышей-альбиносов суточного возраста со средней массой тела 29,6 г. Через шесть недель применения этилового спирта у мышей сформировалось ожирение печени. Проведенные на этом этапе исследования тканей печени, биохимический и гематологический анализы крови, а также анализ газового состава демонстрировали ухудшение всех показателей. Для доказательства эффективности применения термальной воды при лечении алкогольной жировой дистрофии печени были сформированы две группы по 25 мышей в каждой. Животных контрольной группы выпаивали водопроводной водой, а также устраивали из нее ежедневные часовые ванны. Мышей опытной группы поили термальной водой, а также купали в ней по 15 мин каждый день. Гистологические исследования и анализы крови проводили на 1, 7, 14 и 21-е сут эксперимента у 5 произвольно выбранных из каждой группы животных. На 21-е сут исследования у животных опытной группы наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, а также уровней аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы, липопротеинов низкой плотности, концентрации общего холестерина, триглицеридов. Также наблюдалось увеличение уровней эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, общего белка, альбумина и липопротеинов высокой плотности ($p < 0,05$). Положительная динамика наблюдалась также по результатам гистопатологического анализа. В то же время у животных контрольной группы ярко выраженной положительной динамики не наблюдалось. Более того, микроскопия проб печени показала продолжающийся процесс дегенерации тканей. Полученные данные позволяют сделать вывод о целесообразности применения термальной воды для лечения алкогольной жировой дистрофии печени.

Ключевые слова: бальнеотерапия, биохимия, гематология, гистопатология, жировая дистрофия печени.

Благодарность: Авторы выражают признательность Mr. Suayp Demirel за его поддержку во время исследования.

Для цитирования: Elitok Bülent, Kışlalioğlu Ibrahim, Ulusoy Yavuz, Kiliç Bahadır. Исследование лечебного воздействия вод термальных источников провинции Афьон на экспериментально индуцированную жировую дистрофию печени у мышей. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 228–238. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-228-238.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Elitok Bülent, доктор наук, доцент, кафедра терапии факультета ветеринарной медицины, Университет Афьон Коджатепе, 03200, Турция, г. Афьонкарахисар, e-mail: elitok1969@hotmail.com.

Investigation of the healing effects of Afyon Province hot spring waters on experimentally-induced fatty liver in mice

Bülent Elitok¹, Ibrahim Kışlalioğlu², Yavuz Ulusoy³, Bahadır Kiliç⁴

¹ Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

² Ministry of Agriculture and Forestry, Isparta, Turkey

^{3,4} Veterinary Control Central Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey

¹ ORCID: 0000-0003-3336-4479, e-mail: elitok1969@hotmail.com

³ e-mail: yavuz.ulusoy@tarim.gov.tr

⁴ e-mail: bahadir.kilinc@tarim.gov.tr

SUMMARY

Due the increasing number of alcoholic fatty liver disease cases in the world, the development of methods for treating this disease is an urgent task. According to different publications mineral water from hot springs has a beneficial effect on liver cells. In this regard, an investigation was performed with the aim to assess the effectiveness of hot spring water from the Süreyya I spring (Afyonkarahisar province) in treatment of fatty liver disease. 50 one-day-old albino mice with an average body weight of 29.6 g were selected for the experiment. The tests of liver tissue, biochemical and hematological blood tests, as well as blood gas tests performed at this stage, demonstrated deterioration in all parameters. To prove the effectiveness of using hot spring water in the treatment of alcoholic fatty liver disease, two groups of 25 mice each were formed. The animals of the control group were given tap water to drink, and were also bathed (daily) in it for one hour. The mice of the experimental group were given the hot spring water to drink and bathed in it for 15 minutes every day. Histological tests and blood tests were performed on day 1, 7, 14, and 21 of the experiment using five animals randomly selected from each group. On day 21 of the experiment, the animals of the experimental group demonstrated a significant ($p < 0.05$) decrease in the total number of leukocytes, neutrophils, monocytes, as well as in the levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, low-density lipoproteins, total cholesterol, triglycerides. There was also an increase in erythrocyte, hemoglobin, hematocrit, total protein, albumin and high density lipoprotein levels ($p < 0.05$). The results of histopathological analysis also demonstrated positive dynamics. At the same time, no pronounced positive dynamics was observed in animals of the control group. Moreover, microscopy of liver samples showed an ongoing process of tissue degeneration. The data obtained allow us to conclude that it is advisable to use the hot spring water for the treatment of alcoholic fatty liver disease.

Key words: balneotherapy, biochemistry, hematology, histopathology, fatty liver.

Acknowledgements: The authors acknowledge to Mr. Suayp Demirel for his supports during the study.

For citation: Elitok Bülent, Kışlalioğlu Ibrahim, Ulusoy Yavuz, Kiliç Bahadır. Investigation of the healing effects of Afyon Province hot spring waters on experimentally-induced fatty liver in mice. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 228–238. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-228-238.

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

For correspondence: Bülent Elitok, Doctor of Science, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, 03200, Turkey, Afyonkarahisar, e-mail: elitok1969@hotmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Накопление жира в клетках печени, превышающее 5% от общей массы печени, называется жировой дистрофией печени (ЖДП). В мире наблюдается тенденция к увеличению случаев заболевания ЖДП [1]. Одной из основных причин, наряду с генетической предрасположенностью, является чрезмерное употребление алкоголя (> 20 г/день) [2]. Алкоголь увеличивает всасывание жиров в печень из кишечника и синтез жирных кислот (липогенез) и уменьшает усвоение жирных кислот (за счет уменьшения бета-окисления жирных кислот), провоцирует накопление жира в клетках печени и в итоге вызывает алкогольную жировую дистрофию печени (АЖДП) [1, 3]. Исследования последних лет доказывают, что АЖДП может способствовать развитию гепатита, цирроза [4] и даже рака [5].

При АЖДП происходят гематологические, биохимические и гистопатологические изменения. Алкоголь усиливает транслокацию бактерий из кишечника и приводит к повышенному поглощению бактериальных липополисахаридов, которые вызывают воспаление путем активации клеток Купфера [6]. Поэтому лейкоцитоз и тромбоцитопения часто встречаются у пациентов с алкогольным стеатогепатитом [7]. Наиболее распространенной биохимической особенностью является 2–4-кратное повышение содержания трансаминаз (AST – аланинаминотрансферазы и ALT – аспартатаминотрансферазы) [8]. Важной гистопатологической особенностью у заболевших ЖДП является наличие жировых вакуолей в гепатоцитах в микроциркулярной или макроциркулярной форме, а также в их комбинации [9].

Имеются данные, что термальные ванны вносят значительный вклад в профилактику гепатита, сокращая частоту возникновения хронического гепатита и снижая портальное давление. Употребление воды из термального источника уменьшает ожирение печени, стабилизирует углеводный и липидный обмен, предотвращает развитие патологического процесса [3].

Целью данного исследования была оценка терапевтической эффективности воды из термального источника Süreyya I (внутреннее и наружное (ванны) применение), содержащей минералы и микроэлементы, при лечении АЖДП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Практическая часть работы выполнена в Центре прикладных и экспериментальных исследований животных Университета Афьон Коджатеппе в соответствии с инструкциями Комитета по этике Университета экспериментальных исследований животных Афьон Коджатеппе (AKUHADYЕК) согласно отчету под номером 42-18 и была утверждена в качестве магистерской диссертации Комитетом по научно-исследовательским проектам Университета Афьон Коджатеппе (BAPK) под номером 18.SAĞ.BİL.11.

В исследовательском проекте использовали 50 мышей-альбиносов суточного возраста со средней массой тела 29,6 г, которых содержали в пластиковых клетках и обеспечивали им оптимальные условия влажности и температуры. Во время исследования животные получали специализированный корм в неограниченном количестве.

Таблица 1

Прибавка в весе, самочувствие и наличие поражений до исследования, после ожирения печени и проведенного лечения животных

Table 1
Weight gain, bouyancy and presence of lesions at the stage of before study, after fatty liver disease formation and after treatment in the animals

Сроки измерения показателей по группам		Среднее значение потери/набора веса (г)	Активность животных / Формирование клинических поражений
BS (n = 50)		29,6 ^b (25,4–32,5)	Активность и аппетит (+++), поражения (–)
AFLF (n = 44)		31,6 ^a (26,3–32,1)	Активность и аппетит (+++), 2 мыши умерли, 4 мыши были оперативно обследованы, поражения (–)
AT 1-е сут	CG (n = 21)	31,5 ^a (26,3–32,0)	Активность и аппетит (+++), 1 мышь умерла, 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)
	SG (n = 22)	31,70 ^a (26,4–32,1)	Активность и аппетит (+++), 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)
AT 7-е сут	CG (n = 15)	31,26 ^a (26,3–31,64)	Активность и аппетит (+++), 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)
	SG (n = 15)	30,02 ^b (24,2–30,4)	Активность и аппетит (+++), 1 мышь умерла, 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)
AT 14-е сут	CG (n = 9)	30,64 ^{ab} (25,6–31,0)	Активность и аппетит (+++), 1 мышь умерла, 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)
	SG (n = 10)	30,12 ^b (24,0–30,2)	Активность и аппетит (+++), 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)
AT 21-е сут	CG (n = 4)	30,23 ^b (25,6–31,0)	Активность и аппетит (+++), 4 мыши были оперативно обследованы, поражения (–)
	SG (n = 5)	28,02 ^c (23,1–28,9)	Активность и аппетит (+++), 5 мышей были оперативно обследованы, поражения (–)

^{a-c}Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).^{a-c}The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), AFLF – после ожирения печени (after fatty liver formation), AT – после лечения (after treatment), CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group).

Через шесть недель после формирования алкогольной жировой дистрофии печени с использованием этилового спирта [10] животные были произвольно разделены на две группы: CG – контрольную ($n = 25$) и SG – опытную ($n = 25$), и проводили лечение в течение 21 сут. В поилки мышей контрольной группы добавляли обычную водопроводную воду, а опытной группы – свежую воду из термального источника. Животных в питье не ограничивали. Кроме того, мышей контрольной группы купали ежедневно в течение часа в водопроводной воде при температуре $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$. Животных опытной группы купали при той же температуре в свежей воде из термального источника в течение 15 мин, после чего их промокали мягким полотенцем и аккуратно досушивали феном. Для проведения гистопатологических [11], гематологических, биохимических исследований и изучения газового состава крови на 1, 7, 14 и 21-е сут лечения у пяти произвольно выбранных из каждой группы особей брали пробы крови и ткани печени для анализа.

Свойства термальной воды. Термальный источник вулканического происхождения Süreyu I является единственным в регионе источником с содержанием диоксида углерода. Медицинский факультет Çара, от-

деление медицинской экологии, гидроклиматологии Стамбульского университета относят его к классу термоминеральных вод, содержащих гидрокарбонат натрия, углекислый газ, фтор и кремний. Минерализация воды, согласно отчету санитарно-гигиенической лаборатории, составляет 4046,8 мг/л. Хотя это и не указано, вода источника также относится к классу кальциевой воды, поскольку содержание кальция составляет > 150 мг/л.

При проведении *клинических исследований* учитывали следующие параметры: вес тела (Т), активность, потребление корма и воды, наличие поражений, температура тела, частота сердечных сокращений (Р) и частота дыхания (R) животных.

Гематологические исследования. С использованием коммерческих тест-наборов и гематологического анализатора Chemray Brand определяли такие гематологические показатели, как количество эритроцитов (RBC), общее количество лейкоцитов (WBC), гематокрит (HCT), гемоглобин (Hb), средний объем эритроцитов (MCV), концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), содержание лимфоцитов (LYM), нейтрофилов (NEUT), эозинофилов (EOS), моноцитов (MON) и базофилов (BAS).

Биохимические исследования крови. Аланинаминотрансферазу (ALT), аспаратаминотрансферазу (AST), общий белок (TP), альбумин (ALB), мочевины (UREA), глюкозу (GLU), триглицериды (TRIG), общий холестерин (TCOL), липопротеины высокой плотности (HDL), липопротеины низкой плотности (LDL) и магний (Mg) измеряли с использованием биохимического анализатора Cobas Integra 400 Plus Roche (Roche Diagnostics GmbH, Германия).

Анализ газового состава крови. После взятия образцов крови в пластиковые шприцы с гепарином (500 ME приготовленного заранее жидкого препарата на 1 мл крови) проводились измерения pH, парциального давления углекислого газа ($p\text{CO}_2$), общей концентрации углекислого газа (TCO_2), избытка оснований (BE), бикарбоната (HCO_3^-) хлора (Cl), натрия (Na^+), калия (K^+), кальция (Ca^{2+}) с использованием портативного анализатора газов крови (прибор для измерения газов крови Edan i15) и коммерческих картриджей.

Гистопатологические исследования. Отбор проб производили под анестезией с использованием ксилазина (10 мг/кг) и кетамина (100 мг/кг). Ткани печени отбирали интракардиальным методом [11] с интервалом в одну неделю от 5 животных, случайно выбранных из обеих групп. Образцы были отправлены в лабораторию в 10%-м формалине, исследования проводились специалистами лаборатории патологии Центрального научно-исследовательского института ветеринарного контроля Министерства сельского и лесного хозяйства.

Статистический анализ результатов по группам проводился по методу ANOVA. Тест Дункана использовался для определения значимости внутригрупповых различий в опытной группе. Статистический анализ проводился с использованием программного обес-

печения SPSS Statistics 18.1 (IBM, США, совместимого с Windows). Данные были выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка и считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данном исследовании пол лабораторных животных не учитывался.

Клинические исследования животных

Данные клинических исследований животных приведены в таблицах 1 и 2.

Из таблицы 1 видно, что в начале лечения средние значения массы тела мышей контрольной группы составляли 31,5 г (минимум – 26,3, максимум – 32,0), мышшей опытной группы – 31,7 г (минимум – 26,4, максимум – 32,1), что не составляет статистической разницы ($p > 0,05$). При измерениях массы тела на 21-е сут исследования было установлено, что средние значения у животных опытной группы были менее статистически значимыми, чем в контрольной группе ($p < 0,05$).

Анализируя данные, приведенные в таблице 2, можно отметить, что на протяжении всего периода исследований температура тела животных обеих групп оставалась в пределах нормы. При этом показатели частоты пульса и дыхания после проведенного лечения ожирения печени значительно различались и были выше у животных контрольной группы ($p < 0,05$).

Гематологические исследования

Результаты гематологических исследований животных контрольной и опытной групп представлены в таблице 3.

Согласно таблице 3, после формирования ожирения печени уровни WBC, NOTR, MON, MCV, MCH значительно увеличались ($p < 0,05$), тогда как уровни RBC, HB, HCT,

Таблица 2
Статистическое сравнение температуры тела, частоты пульса и частоты дыхания

Table 2
Statistical comparison of body temperature, pulse frequency and respiratory rate

Сроки измерения показателей по группам		Показатели ($X \pm SD$)		
		T (°C)	P (ударов/мин)	R (частота/мин)
BS (n = 50)		37,20 \pm 0,14	341,44 \pm 45,10 ^f	126,30 \pm 20,00 ^e
AFLF (n = 44)		37,40 \pm 0,18	432,28 \pm 65,30 ^a	240,14 \pm 35,00 ^a
АТ 1-е сут	CG (n = 21)	37,40 \pm 0,10	413,04 \pm 53,40 ^b	238,28 \pm 33,10 ^a
	SG (n = 22)	37,30 \pm 0,12	392,05 \pm 47,10 ^c	221,24 \pm 32,00 ^b
АТ 7-е сут	CG (n = 15)	37,30 \pm 0,00	402,12 \pm 45,30 ^{bc}	229,00 \pm 25,00 ^{ab}
	SG (n = 15)	37,10 \pm 0,00	376,18 \pm 38,20 ^d	178,10 \pm 24,10 ^c
АТ 14-е сут	CG (n = 9)	37,20 \pm 0,20	398,47 \pm 32,00 ^{bc}	180,34 \pm 24,00 ^c
	SG (n = 10)	37,10 \pm 0,10	360,40 \pm 28,40 ^e	145,18 \pm 20,00 ^d
АТ 21-е сут	CG (n = 4)	37,20 \pm 0,12	374,10 \pm 35,20 ^d	150,30 \pm 22,00 ^d
	SG (n = 5)	37,00 \pm 0,14	337,18 \pm 24,30 ^f	130,34 \pm 16,10 ^e

^{a-f}Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-f}The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), AFLF – после ожирения печени (after fatty liver formation), АТ – после лечения (after treatment), CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group).

Таблица 3
Результаты гематологических исследований крови животных

Table 3
Results of hematology blood tests

Сроки измерения показателей по группам	Показатели (X ± SD)												
	WBC (10 ⁹ /mm ³)	RBC (10 ⁶ /mm ³)	HB (g/dl)	HCT (%)	PLT (10 ³ /mm ³)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	LVM (%)	NEUT (%)	EOS (%)	MON (%)	BAS (%)
BS (n = 50)	8,30 ± 1,40 ^f	7,93 ± 1,16 ^f	13,42 ± 1,24 ^f	43,23 ± 1,24 ^f	284,90 ± 35,24 ^g	53,48 ± 0,26 ^h	16,48 ± 3,06 ⁱ	31,18 ± 2,03 ^a	61,42 ± 5,20 ^a	33,30 ± 3,20 ^f	2,10 ± 1,00	3,40 ± 0,20 ^d	NS
AFIF (n = 44)	15,40 ± 3,20 ^a	4,48 ± 0,43 ^d	8,27 ± 3,43 ^d	32,48 ± 3,22 ^d	186,24 ± 32,08 ^e	72,21 ± 5,14 ^e	18,21 ± 6,11 ^e	25,41 ± 3,12 ^d	47,68 ± 6,40 ^f	45,20 ± 4,10 ^g	2,14 ± 0,10	6,30 ± 1,60 ^c	NS
	CG (n = 21)	4,62 ± 0,64 ^d	8,26 ± 2,05 ^e	31,98 ± 3,06 ^f	184,38 ± 47,86 ^e	68,36 ± 4,04 ^f	17,87 ± 4,23 ^b	25,56 ± 3,11 ^d	48,26 ± 5,30 ^{ef}	45,10 ± 4,30 ^g	2,23 ± 0,12	5,20 ± 1,23 ^b	NS
AT 1-е сут	14,06 ± 2,30 ^{bc}	5,83 ± 0,57 ^e	9,54 ± 2,28 ^e	33,46 ± 2,68 ^e	198,12 ± 55,46 ^{de}	57,14 ± 4,08	16,15 ± 3,22 ^c	28,51 ± 3,24 ^c	52,18 ± 4,40 ^d	42,20 ± 3,60 ^b	2,16 ± 0,04	4,10 ± 1,22 ^c	NS
	CG (n = 15)	5,38 ± 1,10 ^e	8,90 ± 2,11 ^d	32,88 ± 2,27 ^e	186,27 ± 38,22 ^e	61,03 ± 4,28 ^e	16,37 ± 2,11 ^c	27,12 ± 2,23 ^c	49,27 ± 5,10 ^e	44,40 ± 3,00 ^a	2,16 ± 0,20	5,00 ± 1,32 ^b	NS
AT 7-е сут	13,34 ± 2,16 ^c	6,80 ± 1,24 ^b	10,38 ± 2,00 ^{bc}	37,40 ± 2,06 ^e	214,45 ± 33,26 ^e	55,23 ± 3,32 ^e	15,32 ± 2,08 ^d	27,70 ± 2,03 ^c	55,18 ± 4,34 ^c	40,20 ± 2,30 ^c	2,40 ± 1,40	3,04 ± 1,20 ^d	NS
	CG (n = 9)	5,79 ± 1,23 ^c	9,41 ± 2,08 ^e	33,29 ± 2,08 ^e	196,02 ± 27,62 ^{de}	57,22 ± 3,20 ^d	16,21 ± 1,24 ^c	28,04 ± 1,16 ^c	51,24 ± 4,10 ^d	42,50 ± 2,18 ^b	2,18 ± 0,06	5,69 ± 1,42 ^{ab}	NS
AT 14-е сут	10,28 ± 1,54 ^e	7,86 ± 1,02 ^b	11,27 ± 1,68 ^b	40,16 ± 1,43 ^b	248,27 ± 28,48 ^b	51,23 ± 2,35 ^f	14,25 ± 1,00 ^e	28,14 ± 0,68 ^e	57,04 ± 3,28 ^b	36,28 ± 2,00 ^e	2,15 ± 0,00	4,03 ± 0,50 ^c	NS
	CG (n = 4)	6,23 ± 1,16 ^b	9,87 ± 1,24	35,87 ± 1,66 ^d	201,26 ± 24,32 ^d	57,52 ± 2,22 ^d	15,60 ± 0,55 ^d	27,43 ± 0,55 ^c	54,16 ± 4,24 ^c	38,14 ± 2,10 ^d	2,16 ± 0,00	5,10 ± 0,40 ^b	NS
AT 21-е сут	9,02 ± 1,23 ^f	7,98 ± 1,18 ^a	12,98 ± 1,18 ^a	43,07 ± 1,18 ^a	279,84 ± 21,16 ^a	53,86 ± 1,16 ^a	16,21 ± 0,43 ^c	30,04 ± 0,38 ^b	61,80 ± 2,40 ^a	33,12 ± 1,60 ^f	2,10 ± 0,20	3,28 ± 0,30 ^d	NS
	SG (n = 5)												

^{a-g} Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-g} The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), AFIF – после ожирения печени (after fatty liver formation), AT – после лечения (after treatment),

CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group), NS – не значимо (non-significant).

WBC – лейкоциты (white blood cells), RBC – эритроциты (red blood cells), HB – гемоглобин (hemoglobin), HCT – гематокрит (hematocrit),

PLT – тромбоциты (platelets), MCV – средний объем эритроцитов (mean corpuscular volume),

MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin),

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin concentration),

LVM – лимфоциты (lymphocyte), NEUT – нейтрофилы (neutrophils), EOS – эозинофилы (eosinophils), MON – моноциты (monocyte),

BAS – базофилы (basophils).

Таблица 4
Результаты биохимических исследований крови животных

Table 4
Blood biochemical findings of the animals

Сроки измерения показателей по группам	Показатели (X ± SD)													
	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (g/dl)	Mg (mmol/L)	TLPD (mg/dl)	TCHOL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	TRIG (mg/dl)	CREA (mg/dl)	UREA (mg/dl)
BS (n = 50)	94,62 ± 4,24	58,68 ± 6,18 ^a	3,55 ± 0,14 ^e	55,74 ± 6,18 ^a	34,14 ± 0,48 ^a	1,68 ± 0,12 ^a	1,63 ± 0,18 ^a	218,44 ± 23,28 ^e	88,71 ± 8,04 ^f	42,82 ± 6,40 ^e	68,24 ± 17,32 ^e	95,12 ± 15,1 ^e	0,58 ± 0,05 ^f	8,65 ± 3,18 ^e
AFLF (n = 44)	248,74 ± 16,14 ^b	165,84 ± 14,23 ^a	8,68 ± 2,13 ^a	36,04 ± 5,32 ^{de}	22,02 ± 0,54 ^g	0,89 ± 0,24 ^e	0,64 ± 0,04 ^{di}	459,48 ± 45,26 ^a	176,18 ± 46,12 ^a	23,28 ± 9,23 ^e	136,28 ± 23,44 ^a	207,25 ± 34,12 ^a	3,64 ± 1,05 ^a	15,42 ± 6,27 ^a
AT 1-е с/т	CG (n = 21)	243,12 ± 14,27 ^a	167,49 ± 15,16 ^a	8,45 ± 0,54 ^a	35,42 ± 6,04 ^e	0,90 ± 0,20 ^e	0,65 ± 0,16 ^f	458,21 ± 47,14 ^a	174,24 ± 48,13 ^a	23,31 ± 8,65 ^e	135,45 ± 25,16 ^a	206,43 ± 35,21 ^a	3,63 ± 1,12 ^a	15,32 ± 7,12 ^a
	SG (n = 22)	242,26 ± 16,23 ^b	162,47 ± 16,32 ^b	8,32 ± 0,47 ^a	37,10 ± 7,23 ^d	24,04 ± 0,46 ^{ef}	0,91 ± 0,19 ^e	0,68 ± 0,22 ^d	456,03 ± 48,18 ^a	173,45 ± 45,71 ^a	24,12 ± 9,27 ^e	134,12 ± 23,04 ^b	3,62 ± 1,16 ^a	15,04 ± 6,45 ^a
AT 7-е с/т	CG (n = 15)	222,18 ± 14,43 ^b	151,48 ± 14,30 ^b	8,18 ± 0,36 ^a	38,18 ± 5,44 ^{cd}	25,18 ± 0,43 ^e	0,73 ± 0,12 ^d	432,27 ± 35,86 ^b	167,16 ± 38,27 ^{ab}	25,16 ± 12,21 ^e	130,28 ± 21,25 ^{ab}	202,28 ± 25,34 ^b	3,54 ± 1,04 ^b	14,03 ± 4,16 ^b
	SG (n = 15)	187,74 ± 15,65 ^d	132,61 ± 13,26 ^c	7,44 ± 0,28 ^b	41,32 ± 4,66 ^c	28,15 ± 0,34 ^{cd}	0,92 ± 0,04 ^{bc}	345,27 ± 27,21 ^d	122,05 ± 27,34 ^d	35,48 ± 11,51 ^c	112,31 ± 15,14 ^c	178,27 ± 18,23 ^b	2,14 ± 0,64 ^c	11,21 ± 3,09 ^d
AT 14-е с/т	CG (n = 9)	204,18 ± 12,32 ^c	141,74 ± 14,25 ^{bc}	7,69 ± 0,24 ^b	39,23 ± 5,45 ^{cd}	27,64 ± 0,33 ^d	1,02 ± 0,16 ^d	416,25 ± 31,14 ^c	160,21 ± 28,12 ^b	27,28 ± 10,21 ^{de}	126,05 ± 14,48 ^b	184,24 ± 19,40 ^{ab}	2,72 ± 1,02 ^b	12,36 ± 3,07 ^c
	SG (n = 10)	161,28 ± 11,43 ^f	106,43 ± 9,46 ^e	5,03 ± 0,12 ^d	47,08 ± 3,46 ^f	31,82 ± 0,33 ^{cb}	1,48 ± 0,13 ^b	1,20 ± 0,04 ^b	106,12 ± 11,22 ^e	40,14 ± 7,22 ^b	83,26 ± 7,41 ^d	130,34 ± 12,22 ^d	0,96 ± 0,27 ^e	9,01 ± 1,16 ^e
AT 21-е с/т	CG (n = 4)	183,78 ± 10,44 ^e	129,75 ± 8,55 ^d	6,65 ± 0,11 ^c	42,21 ± 4,33 ^c	29,18 ± 0,26 ^c	1,06 ± 0,09 ^d	398,00 ± 13,15 ^c	144,21 ± 12,23 ^c	30,16 ± 8,13 ^d	108,07 ± 8,10 ^c	158,21 ± 13,11 ^c	1,48 ± 0,15 ^d	11,27 ± 1,20 ^d
	SG (n = 5)	114,76 ± 9,20 ^g	62,48 ± 5,42 ^f	3,88 ± 0,07 ^e	55,19 ± 2,24 ^g	33,18 ± 0,17 ^{ab}	1,69 ± 0,05 ^a	203,28 ± 11,23 ^e	87,18 ± 5,03 ^f	43,02 ± 5,14 ^e	67,32 ± 6,13 ^e	101,20 ± 9,20 ^c	0,60 ± 0,04 ^f	8,42 ± 0,22 ^e

^{a-g} Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-g} The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), AFLF – после ожирения печени (after fatty liver formation), AT – после лечения (after treatment),

CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group).

AST – аспаратаминотрансфераза (aspartate transaminase), ALT – аланинаминотрансфераза (alanine aminotransferase),

GGT – гамма-глутамилтрансфераза (gamma-glutamyl transferase), TP – общий белок (total protein), ALB – альбумин (albumin), GLU – глюкоза (glucose),

Mg – магний (magnesium), TLPD – общие липиды (total lipids), TCHOL – общий холестерин (total cholesterol),

HDL – липопротеины высокой плотности (high-density lipoproteins), LDL – липопротеины низкой плотности (low density lipoprotein),

TRIG – триглицериды (triglycerides), CREA – креатинин (creatinine), UREA – мочевины.

Таблица 5
Результаты исследования газового состава крови

Table 5
Blood gases findings of the animals

Сроки измерения показателей по группам	Показатели (X ± SD)										
	pH	pCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	BE (mEq/L)	TCO ₂ (mmol/L)	LACT (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Na ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	
BS (n = 50)	7,35 ± 0,02 ^a	43,18 ± 0,32 ^a	23,54 ± 0,36 ^a	-2,0 ± 0,02 ^a	15,32 ± 0,44 ^a	4,45 ± 0,58 ^{cd}	8,48 ± 1,05 ^a	157,40 ± 1,42 ^e	113,29 ± 1,35 ^h	10,31 ± 1,33 ^a	
AT 1-е сут	7,24 ± 0,03 ^f	35,64 ± 1,33 ^e	14,86 ± 0,26 ^b	-11,4 ± 0,04 ^f	12,27 ± 2,30 ^f	6,68 ± 1,27 ^a	5,34 ± 1,26 ^d	243,70 ± 12,18 ^a	187,30 ± 9,20 ^b	6,28 ± 1,32 ^c	
	CG (n = 21)	7,24 ± 0,03 ^f	35,19 ± 1,50 ^e	14,64 ± 0,50 ^b	-11,6 ± 0,04 ^f	12,05 ± 2,22 ^f	6,60 ± 1,23 ^a	5,19 ± 1,27 ^d	234,28 ± 11,20 ^b	183,32 ± 9,22 ^a	6,43 ± 1,04 ^c
SG (n = 22)	7,27 ± 0,02 ^e	33,62 ± 1,34 ^e	14,94 ± 0,38 ^f	-10,6 ± 0,03 ^e	11,61 ± 1,40 ^e	5,88 ± 1,41 ^b	5,12 ± 1,16 ^d	202,27 ± 7,14 ^b	171,40 ± 5,30 ^b	7,28 ± 0,64 ^d	
AT 7-е сут	7,26 ± 0,01 ^e	34,19 ± 1,45 ^d	14,13 ± 0,30 ^b	-10,8 ± 0,03 ^e	11,70 ± 1,35 ^a	6,18 ± 1,40 ^b	5,23 ± 1,02 ^d	217,26 ± 5,40 ^{ab}	166,18 ± 6,23 ^c	7,01 ± 0,55 ^b	
	SG (n = 15)	7,35 ± 0,02 ^{cd}	38,65 ± 1,31 ^c	14,85 ± 0,27 ^c	-10,8 ± 0,03 ^c	12,08 ± 0,34 ^c	4,94 ± 0,52 ^c	6,46 ± 0,78 ^c	139,18 ± 3,42 ^d	9,27 ± 0,36 ^b	
AT 14-е сут	7,30 ± 0,02 ^d	35,24 ± 1,38 ^{cd}	20,63 ± 0,20 ^e	-4,2 ± 0,01 ^d	12,62 ± 0,28 ^d	5,86 ± 0,78 ^b	5,88 ± 0,64 ^{cd}	204,24 ± 4,10 ^{ab}	145,20 ± 3,36 ^e	8,45 ± 0,43 ^c	
	SG (n = 10)	7,38 ± 0,02 ^b	41,07 ± 0,33 ^b	23,52 ± 0,22 ^b	-1,2 ± 0,01 ^b	14,70 ± 0,26 ^b	4,67 ± 0,28 ^c	7,38 ± 0,45 ^b	123,28 ± 1,60 ^g	10,12 ± 0,26 ^a	
AT 21-е сут	7,32 ± 0,01 ^d	36,19 ± 0,37 ^c	18,02 ± 0,10 ^d	-7,1 ± 0,02 ^d	12,66 ± 0,21 ^c	5,15 ± 0,36 ^{xc}	6,78 ± 0,36 ^c	179,21 ± 2,76 ^c	134,26 ± 0,43 ^f	9,02 ± 0,17 ^b	
	SG (n = 5)	7,42 ± 0,01 ^a	43,82 ± 0,03 ^a	27,51 ± 0,12 ^a	-3,1 ± 0,01 ^a	16,01 ± 0,12 ^a	4,12 ± 0,18 ^d	8,68 ± 0,19 ^a	111,28 ± 0,31 ^h	10,89 ± 0,14 ^a	

^{a-h}Значения в столбце являются статистически значимыми ($p < 0,05$).

^{a-h}The values in the column are statistically significant ($p < 0,05$).

BS – до исследования (before study), AFLF – после ожирения печени (after fatty liver formation),

AT – после лечения (after treatment), CG – контрольная группа (control group), SG – опытная группа (study group).

pH – концентрация ионов водорода (hydrogen ion concentration), pCO₂ – парциальное давление углекислого газа (CO₂ partial pressure),

HCO₃⁻ – бикарбонат (bicarbonate), BE – сдвиг буферных оснований (base excess), TCO₂ – общая концентрация углекислого газа (total CO₂),

LACT – лактат (lactate), K⁺ – калий (potassium), Na⁺ – натрий (sodium), Cl⁻ – хлор (chlorine), Ca²⁺ – кальций (calcium).

LYM, PLT и MCHC в значительной степени снизились ($p < 0,05$). После лечения средние значения WBC, NOTR, MON, MCV и MCH в крови животных опытной группы были ниже по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,05$), а показатели RBC, Hb, HCT, LYM и PLT были выше ($p < 0,05$).

Биохимические исследования крови

Средние результаты биохимического анализа крови показаны в таблице 4. Из представленных в ней результатов видно, что после формирования ожирения печени уровни AST, ALT, GGT, UREA, CREA, TCHOL, TRIG и LDL значительно увеличились ($p < 0,05$), а уровни TP, ALB, HDL, GLU и Mg значительно снизились ($p < 0,05$). На 21-е сут лечения TP, ALB, HDL, GLU и Mg повысились, а уровни AST, ALT, GGT, UREA, CREA, TCHOL, TRIG и LDL снизились в обеих группах. Следует отметить, что изменения у животных опытной группы были статистически значимыми ($p < 0,05$) по сравнению с животными контрольной группы.

Исследования газового состава крови

Статистическое сравнение исследований газового состава крови представлено в таблице 5.

При анализе полученных результатов было отмечено, что pH, pCO_2 , BE, HCO_3^- , Ca^{2+} , TCO_2 и K^+ снизились после развития ожирения печени, в то время как уровни LACT, Na^+ и Cl^- увеличились. Установлено, что при лечении водой из термального источника животные восстанавливались быстрее по сравнению с животными контрольной группы.

Результаты гистопатологических исследований

При проведении гистопатологических исследований после применения этилового спирта были обнаружены признаки жировой дистрофии печени: внутрицитоплазматическое, микровезикулярное накопление жира, а в некоторых случаях макро- и микроваскулярные поражения. Иногда наблюдали интенсивную паренхиматозную дегенерацию и некроз с образованием жировых отложений (рис. 1).

В последний день эксперимента было обнаружено, что образование жировых включений продолжалось у животных контрольной группы, получавших водопроводную воду (рис. 2). У животных, которых лечили водой из термального источника, наблюдалось уменьшение признаков дистрофии печени (рис. 3). Срезы и фотографии по каждому измерению архивировались.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что средняя масса тела мышей (31,6 г) после применения этилового спирта была выше по сравнению со средней массой тела (29,6 г) до начала испытания. На 21-е сут эксперимента среднее значение массы тела животных контрольной группы (30,23 г) было выше, чем среднее значение у животных из опытной группы (28,02 г). Этот результат подтверждается другими исследованиями [3], в которых сообщается, что этиловый спирт вызывает увеличение массы тела, формируя ожирение печени, и что применение воды из термальных источников приводит к нормализации веса за счет сжигания жиров и уменьшения их транспорта из кишечника. Установлено, что увеличение таких показателей, как частота дыхания и сердечных сокращений, было статистически значимым ($p < 0,05$) у животных с признаками ожирения

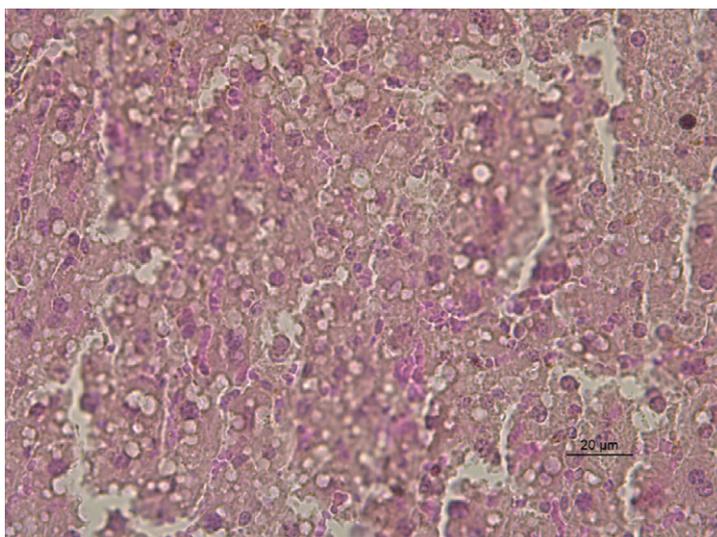


Рис. 1. Поражение печени у мышей после применения этилового спирта (увеличение 10х–40х)

Fig. 1. Formation of fatty liver in mice treated with ethyl alcohol (10x–40x)

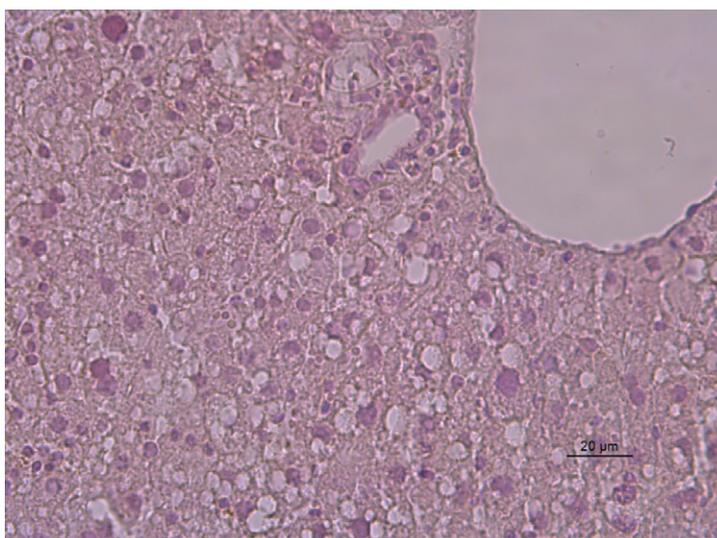


Рис. 2. Паренхиматозная дегенерация печени на 21-е сут у животных контрольной группы (увеличение 10х–40х)

Fig. 2. Ongoing parenchymal degeneration and fattening at the end of day 21 in control animals (10x–40x)

печени, что согласуется с данными литературных источников [10].

Наблюдалось, что показатели WBC и LYM, которые первоначально были высокими, снизились у животных опытной группы. Установлено, что полученные результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями [12], которые указывают на то, что воды из термальных источников оказывают иммуносупрессивное действие и что количество Т-лимфоцитов в крови значительно снижается при использовании гипертермальных ванн, а гипертермальные воды, в свою очередь, стимулируют выработку адренокортикотропного гормона (АСТН) и кортизола, которые становятся причиной Т-лимфоцитопении и эозинопении.

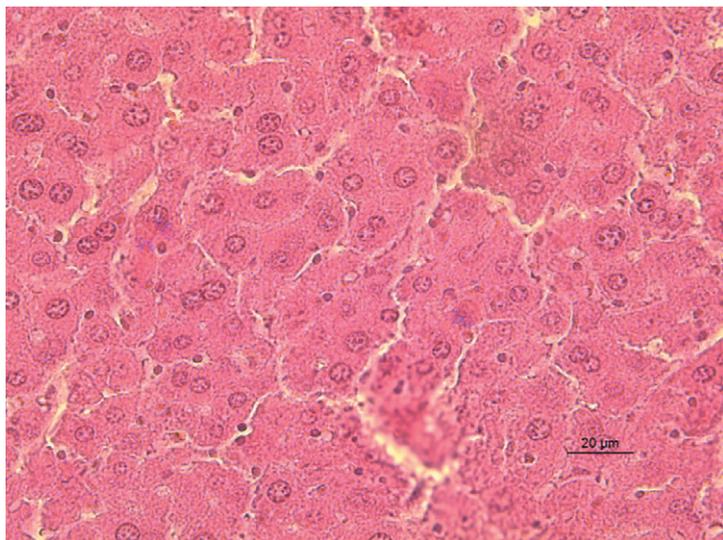


Рис. 3. Внешний вид печени у мышей, получавших воду из термального источника Süreyya I, на 21-е сут исследования (увеличение 10х–40х)

Fig. 3. Normal liver appearance in mice treated with Süreyya I hot spring water at the end of day 21 (10x–40x)

Сообщалось, что хроническое употребление алкоголя приводит к повышению уровня MCV и WBC при снижении уровня PLT [13], эти показатели возвращаются к нормальному уровню после прекращения употребления алкоголя [14]. Полученные при проведении эксперимента данные согласуются с информацией из литературных источников: в последний день исследования были получены более высокие показатели уровней MCV, WBC и более низкие PLT по сравнению с первым днем эксперимента и животными контрольной группы.

По данным В. Hock et al., увеличение MCV является важным биомаркером хронической алкогольной зависимости [15]. Повышение уровней этого показателя сигнализирует о воспалении, приводящем к дефициту магния, активации лейкоцитов и макрофагов, а также избыточной продукции свободных радикалов [16]. Считается, что магний способствует нормализации уровня лейкоцитов и эритроцитов, проявляя противовоспалительный эффект. Поскольку вода из термального источника Süreyya I, используемая в нашем исследовании, богата магнием, в эксперименте наблюдали нормализацию этих показателей.

В процессе эксперимента у животных с ожирением печени уровни TRIG, LDL, TCHOL были значительно увеличены, уровни холестерина HDL – снижены, однако в процессе лечения водой из термального источника у животных опытной группы липидный профиль постепенно повышался и достигал нормального уровня в последнюю неделю. Эти результаты согласуются с данными других исследований [17], в которых сообщается, что применение минеральной воды в экстренных случаях или на регулярной основе оказывает стойкое действие на липидный профиль крови. Это подтверждают С. L. Hsu et al. [18], сообщившие, что термальные воды, богатые минералами, снижали уровень TCHOL за счет увеличения выделения холестерина и желчи с калом.

Эффективное воздействие минеральных вод на ожирение достигается благодаря механизму стимуляции митохондриального биогенеза и содержания в них Mg и Ca, нормализующих липидный обмен [19]. Магний снижает накопление липидов и способствует экскреции избыточного холестерина [20]. Y. Kishimoto et al. указали, что употребление магния также ингибирует всасывание жира в кишечнике и может улучшить постпрандиальную гиперлипидемию у здоровых людей [21]. М. Kimura et al. показали, что минеральная вода, содержащая 600 и 1000 ppm (млн⁻¹) магния, может снизить уровень холестерина на 18 и 15% соответственно [22]. Также сообщалось, что богатая магнием вода уменьшает перекисное окисление липидов за счет увеличения печеночной активации липопротеиновых рецепторов низкой плотности и активации гена холестерин-7α-гидроксилазы (CYP7A1), которые играют важную роль в катаболизме холестерина, что приводит к снижению уровня TCHOL и LDL [23]. Тем не менее имеются опубликованные данные о том, что богатые магнием минеральные воды лечат ожирение печени, ингибируя синтез холестерина и жирных кислот путем повышения уровня АМР-активированной протеинкиназы [24].

Кальций в рационе предотвращает накопление липидов в адипоцитах, усиливает липолиз и таким образом значительно ускоряет потерю веса. Также было показано, что кальцитриолы, высвобождаемые в результате низкокальциевой диеты, стимулируют приток кальция в адипоциты человека и таким образом способствует ожирению [25]. Однако, по сообщению N. Nani et al., снижению жира способствуют и другие элементы [26]. Гидрокарбонат HCO_3^- является одним из ведущих в данной группе, имеются сообщения, что вода с высоким содержанием ионов HCO_3^- снижает общий холестерин и LDL [17]. Вода из термального источника Süreyya I, используемая для лечебных целей, входит в класс бикарбонатных термальных вод и имеет высокую концентрацию HCO_3^- , а также высокий уровень содержания Mg и Ca. Самый высокий уровень HCO_3^- в проведенном исследовании наблюдали у животных опытной группы, также у мышей этой группы наблюдали самые низкие уровни TCHOL, LDL и TRIG. Сообщалось, что хлорсодержащая бикарбонатная вода стимулирует выведение желчных кислот и снижает концентрацию TRIG в кишечнике [27].

Установлено, что после формирования АЖДП уровни AST, ALT, GGT, UREA и CREA были высокими, а TP, ALB, GLU, HDL – низкими. На протяжении всего эксперимента у животных, получавших воду из термального источника Süreyya I, наблюдалась постоянная положительная динамика по этим показателям по сравнению с животными из контрольной группы. Аналогичные результаты были изложены в исследовании С. Pereira et al., сообщавшем, что повышенные уровни AST, ALT, GGT, UREA, CREA снижались у мышей с метаболическим синдромом, тогда как пониженные уровни TP, ALB, HDL повышались [16]. Уровни AST и ALT в плазме крови считаются важными маркерами в выявлении поражений печени [28]. I. Chen et al. утверждали, что лечение с применением минеральных вод уменьшало накопление липидов в печени, увеличивая их ежедневное выделение с фекалиями [29]. Также сообщалось, что богатые минералами воды снижают перекисное окисление липидов и связанное

с ним содержание печеночного малонового диальдегида (MDA) в печени и предотвращают поражение печени. Содержащиеся в воде бор и магний повышают антиоксидантную способность и снижают высокие уровни ALT и AST [18].

Сообщалось, что уровни ALB, TP, Mg и K (аналогично результатам проведенного исследования) были значительно снижены у пациентов с АЖДП, тогда как уровни GGT и билирубина были повышены, что является важным маркером заболевания [30]. Высокий уровень GGT и низкий уровень TP, ALB, Mg и K, полученные в данной работе, подтверждают выводы исследователей. Исцеление животных опытной группы доказывает эффективность лечения водой из термального источника при АЖДП. Это подтверждается исследованиями M. Zilae et al., где сообщалось, что прием ванн и воды из термального источника нормализует поступление минералов и белков из кишечника, снижая портальное давление [9].

Чрезмерное употребление алкоголя вызывает ketoацидоз, связанный с метаболическим ацидозом [27]. В этом случае обнаруживается снижение уровня pH в крови, уровня pCO_2 и HCO_3^- и повышение уровня LACT [31]. Эти же изменения наблюдались в процессе эксперимента у животных с АЖДП. Однако после начала лечения водой из термального источника Süreyya I у животных опытной группы началось обратное изменение этих параметров, и они приблизились к физиологическим нормам к моменту окончания эксперимента. L. Xu et al. сообщали, что после 21-дневной бальнеотерапии уровни LACT значительно снизились наряду с увеличением уровней TCO_2 , однако это увеличение не было статистически значимым [32].

В представленном исследовании в гистопатологических срезах образцов ткани печени были обнаружены признаки жировой дистрофии: внутрицитоплазматическое, микровезикулярное накопление жира, а в некоторых случаях макро- и микроваскулярные поражения, в отдельных случаях наблюдали интенсивную паренхиматозную дегенерацию и некроз с образованием жировых отложений. Эти данные согласуются с исследованиями, в которых сообщается, что у 90% хронических потребителей алкоголя наблюдаются стеатоз в центрилобулярной или перивенулярной области [33]. В результате гистопатологического сравнения в конце 21-х сут установили, что у животных контрольной группы не произошло нормализации показателей по сравнению с животными опытной группы. Этот результат был обнаружен впервые и представляет собой важную информацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1–18, 20–33 см. REFERENCES)

19. Федорова Т. Е., Ефименко Н. В., Кайсинова А. С. Курортная терапия неалкогольной жировой болезни печени с применением питьевых минеральных вод эссентуцкого типа. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2012; 89 (6): 21–23.

REFERENCES

1. Emiroglu E., Gunes F. E. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ve mikrobijyota. *Türkiye Klinikleri J. Health Sci.* 2018; 3 (3): 254–262. DOI: 10.5336/healthsci.2017-58235.
2. Andronescu C. I., Purcarea M. R., Babes P. A. Nonalcoholic fatty liver disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. *J. Med. Life.* 2018; 11 (1): 20–23. PMID: 29696060; PMCID: PMC5909941.
3. Dogaru G., Stanescu I., Bulboaca A., Motricala M., Rus V., Crăciun C., et al. The therapeutic effect of mineral water from spring 3 in Baile Tusnad in experi-

mental alcoholic liver disease in rats – an electron microscopic study. *Balneol. Res. J.* 2018; 9 (3): 211–215. DOI: 10.12680/balneol.2018.183.

4. Arteel G., Marsano L., Mendez C., Bentley F., McClain C. J. Advances in alcoholic liver disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2003; 17 (4): 625–647. DOI: 10.1016/s1521-6918(03)00053-2.
5. Lee Y., Kwon D.-J., Kim Y. H., Ra M., Heo S. I., Ahn W. G., et al. HIMH0021 attenuates ethanol-induced liver injury and steatosis in mice. *PLoS One.* 2017; 12 (11): e0185134. DOI: 10.1371/journal.pone.0185134.
6. Lucey M. R., Mathurin P., Morgan T. R. Alcoholic hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (26): 2758–2769. DOI: 10.1056/NEJMra0805786.
7. Gao B., Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011; 141 (5): 1572–1585. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.09.002.
8. Gören B., Fen T. Non-alcoholic fatty liver disease: Review. *Turkish J. Med. Sci.* 2005; 25: 841–850.
9. Zilae M., Shirali S. Heat shock proteins and diabetes. *Can. J. Diabetes.* 2016; 40 (6): 594–602. DOI: 10.1016/j.jcjd.2016.05.016.
10. Lange U., Müller-Ladner U., Schmidt K. L. Balneotherapy in rheumatic diseases – an overview of novel and known aspects. *Rheumatol. Int.* 2006; 26 (6): 497–499. DOI: 10.1007/s00296-005-0019-x.
11. Suckow M. A., Danneman P. J., Brayton C. *The Laboratory Mouse*. CRC Press; 2000. 184 p. DOI: 10.1201/9780849376276.
12. Sukenik S., Abu-Shakra M., Flusser D. Balneotherapy in autoimmune diseases. *Isr. J. Med. Sci.* 1997; 33 (4): 258–261. PMID: 9347875.
13. McClain C. J., Song Z., Barve S. S., Hill D. B., Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 287 (3): G497–G502. DOI: 10.1152/ajpgi.00171.2004.
14. Frazier T. H., Stocker A. M., Kershner N. A., Marsano L. S., McClain C. J. Treatment of alcoholic liver disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2011; 4 (1): 63–81. DOI: 10.1177/1756283X10378925.
15. Hock B., Schwarz M., Domke I., Grunert V. P., Wuertemberg M., Schiemann U., et al. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction (Abingdon, England)*. 2005; 100 (10): 1477–1486. DOI: 10.1111/j.1360-0443.2005.01216.x.
16. Pereira C. D., Severo M., Neves D., Ascensão A., Magalhães J., Guimarães J. T., et al. Natural mineral-rich water ingestion improves hepatic and fat glucocorticoid-signaling and increases sirtuin 1 in an animal model of metabolic syndrome. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 2015; 21 (2): 149–157. DOI: 10.1515/hmbci-2014-0032.
17. Schoppen S., Pérez-Granados A. M., Carbajal A., Sarriá B., Sánchez-Muniz F. J., Gómez-Gerique J. A., Pilar Vaquero M. P. Sodium bicarbonate mineral water decreases postprandial lipaemia in postmenopausal women compared to a low mineral water. *Br. J. Nutr.* 2005; 94 (4): 582–587. DOI: 10.1079/bjn20051515.
18. Hsu C. L., Chang Y. Y., Chiu C. H., Yang K. T., Wang Y., Fu S. G., Chen Y. C. Cardiovascular protection of deep-seawater drinking water in high-fat/cholesterol fed hamsters. *Food Chemistry.* 2011; 127 (3): 1146–1152. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.116.
19. Fedorova T. E., Efimenko N. V., Kaisinova A. S. Balneotherapeutics of non-alcoholic fatty liver disease with the use of the Essentuki-type drinking mineral waters. *Problems of Balneology, Physiotherapy, and Exercise Therapy [Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoi fizicheskoi kul'tury]*. 2012; 89 (6): 21–23. (in Russian)
20. Faryadi Q. The magnificent effect of magnesium to human health: A critical review. *Int. J. Appl. Sci. Tech.* 2012; 2 (3): 118–126. Corpus ID: 74000590.
21. Kishimoto Y., Tani M., Uto-Kondo H., Saita E., Iizuka M., Sone H., et al. Effects of magnesium on postprandial serum lipid responses in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition.* 2010; 103 (4): 469–472. DOI: 10.1017/S0007114509992716.
22. Kimura M., Tai H., Nakagawa K., Yokoyama Y., Ikegami Y., Takeda T. Effect of drinking water without salt made from deep sea water in lipid metabolism of rats. In: *Oceans '04 MTS/IEEE Techno-Ocean '04* (IEEE Cat. No. 04CH37600). Kobe; 2004; 1: 320–321. DOI: 10.1109/OCEANS.2004.1402935.
23. Ha B. G., Moon D. S., Kim H. J., Shon Y. H. Magnesium and calcium-enriched deep-sea water promotes mitochondrial biogenesis by AMPK-activated signals pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Biomed Pharmacother.* 2016; 83: 477–484. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.009.
24. Olatunji L. A., Soladoye A. O. Increased magnesium intake prevents hyperlipidemia and insulin resistance and reduces lipid peroxidation in fructose-fed rats. *Pathophysiology.* 2007; 14 (1): 11–15. DOI: 10.1016/j.pathophys.2006.09.004.
25. Zemel M. B. Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J. Am. Coll. Nutr.* 2002; 21 (2): 146S–151S. DOI: 10.1080/07315724.2002.10719212.

26. Mohd Nani S. Z., Majid F. A. A., Jaafar A. B., Mahdzir A., Musa M. N. Potential health benefits of deep sea water: A review. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016; 2016:6520475. DOI: 10.1155/2016/6520475.

27. Zair Y., Kasbi-Chadli F., Housez B., Pichelin M., Cazaubiel M., Raoux F., Ouguerram K. Effect of a high bicarbonate mineral water on fasting and postprandial lipemia in moderately hypercholesterolemic subjects: a pilot study. *Lipids Health Dis.* 2013; 12:105. DOI: 10.1186/1476-511X-12-105.

28. Sheu M. J., Chou P. Y., Lin W. H., Pan C. H., Chien Y. C., Chung Y. L., et al. Deep sea water modulates blood pressure and exhibits hypolipidemic effects via the AMPK-ACC pathway: An *in vivo* study. *Mar. Drug.* 2013; 11 (6): 2183–2202. DOI: 10.3390/md11062183.

29. Chen I. S., Chang Y. Y., Hsu C. L., Lin H. W., Chang M. H., Chen J. W., et al. Alleviative effects of deep-seawater drinking water on hepatic lipid accumulation and oxidation induced by a high-fat diet. *J. Chin. Med. Assoc.* 2013; 76 (2): 95–101. DOI: 10.1016/j.jcma.2012.10.008.

30. Carithers R. L. Jr., Herlong H. F., Diehl A. M., Shaw E. W., Combes B., Fallon H. J., Maddrey W. C. Methylprednisolone therapy in patients with

severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann. Intern. Med.* 1989; 110 (9): 685–690. DOI: 10.7326/0003-4819-110-9-685.

31. Aygencel G. Interpretation of arterial blood gases. *Turk. Kardiyol. Dern. Ars.* 2014; 42 (2): 194–202. DOI: 10.5543/tkda.2014.29499.

32. Xu L., Wu L., Liu T., Xing W., Cao X., Zhang S., Su Z. Effect of a 21-day balneotherapy program on blood cell counts, ponogen levels, and blood biochemical indexes in servicemen in sub-health condition. *J. Phys. Ther. Sci.* 2017; 29 (9): 1573–1577. DOI: 10.1589/jpts.29.1573.

33. Fromenty B., Grimbert S., Mansouri A., Beaugrand M., Erlinger S., Rötig A., Pessayre D. Hepatic mitochondrial DNA deletion in alcoholics: association with microvesicular steatosis. *Gastroenterology.* 1995; 108 (1): 193–200. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90024-1.

Поступила 07.05.2020

Принята в печать 29.06.2020

Received on 07.05.2020

Approved for publication on 29.06.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Bülent Elitok, доцент, доктор наук, кафедра терапии, факультет ветеринарной медицины, Университет Афьон Коджатеппе, г. Афьонкарахисар, Турция.

Ibrahim Kışlalioğlu, магистрант, ветеринарный врач, управление сельского хозяйства провинции, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Испарта, Турция.

Yavuz Ulusoy, доктор наук, заведующий лабораторией патологии, Центральный научно-исследовательский институт ветеринарного контроля, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Анкара, Турция.

Bahadır Kiliç, ветеринарный врач лаборатории патологии, Центральный научно-исследовательский институт ветеринарного контроля, Министерство сельского и лесного хозяйства, г. Анкара, Турция.

Bülent Elitok, Associate Professor, Doctor of Science, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey.

Ibrahim Kışlalioğlu, Master Student, Veterinarian, Provincial Directorate of Agriculture, Ministry of Agriculture and Forestry, Isparta, Turkey.

Yavuz Ulusoy, Doctor of Science, Head of Pathology Laboratory, Veterinary Control Central Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey.

Bahadır Kiliç, Veterinarian, Pathology Laboratory, Veterinary Control Central Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey.

Рецензия на монографию «Вирусные болезни осетров и лососей» Л. П. Бучацкий, Ю. П. Рудь, Н. Н. Матвиенко. Киев: ДИА, 2020. 240 с. ISBN 978-617-7785-10-0

Е. И. Ярыгина

Доктор биологических наук, профессор кафедры радиобиологии и вирусологии имени академиков А. Д. Белова и В. Н. Сюрин ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина», г. Москва, Россия

Для цитирования: Ярыгина Е. И. Рецензия на монографию «Вирусные болезни осетров и лососей» Л. П. Бучацкий, Ю. П. Рудь, Н. Н. Матвиенко. Киев: ДИА, 2020. 240 с. ISBN 978-617-7785-10-0. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 239. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-239.

Peer-review of monograph “Viral Diseases of Sturgeons and Salmon” L. P. Buchatsky, Yu. P. Rud, N. N. Matvienko. K.: DIA, 2020. 240 p. ISBN 978-617-7785-10-0

E. I. Yarygina

Doctor of Science (Biology), Professor, Department of Radiobiology and Virology named after Academists A. D. Belov and V. N. Syurin, FSBEI HE “Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K. I. Skryabin”, Moscow, Russia

For citation: Yarygina E. I. Peer-review of monograph “Viral Diseases of Sturgeons and Salmon” L. P. Buchatsky, Yu. P. Rud, N. N. Matvienko. K.: DIA, 2020. 240 p. ISBN 978-617-7785-10-0. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 239. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-239.

Информация в книге «Вирусные болезни осетров и лососей» соответствует требованиям, предъявляемым к данному виду изданий, и содержит современные сведения по основным вирусным заболеваниям осетровых и лососевых рыб.

В книге 18 глав посвящены различным вирусным заболеваниям рыб и 2 главы – методам лабораторной диагностики, профилактики и лечению вирусных инфекций осетров и лососей.

Впервые авторы подробно представили всемирную историю изучения вирусных заболеваний осетровых и лососевых рыб, описали биологические характеристики вирусов, вызывающих болезни рыб как в природных водоемах, так и в специализированных рыбных хозяйствах Украины. Также дана информация о геномах и представлены схемы строения вирионов вирусов различных семейств, вызывающих поражения представителей аквакультуры.

Книга хорошо иллюстрирована, представлены цветные фотографии, на которых легко определить степень патологических и гистологических изменений у рыб в результате развития эпизоотического процесса, вызванного конкретным представителем царства *Vira*.

Доказательством этиологической роли описанных возбудителей служат результаты полимеразной цепной реакции и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей вирусов, выделенных от инфицированных рыб, в том числе и на Украине.

Авторы представили схему постановки диагноза на вирусные болезни рыб, в которой отражены биологические особенности представителей аквакультуры.

Большой интерес представляет перечень клеточных линий рыб, а также диагностических тест-систем для идентификации вирусных заболеваний осетров и лососей в лаборатории биотехнологии в рыбоводстве Института рыбного хозяйства Национальной академии аграрных наук Украины.

В завершение авторы представили современные данные о методах профилактики и лечения вирусных болезней рыб. Большой интерес для читателя представляет информация о ДНК-вакцинах и схемах вакцинации рыбы.

Достоинством книги является наличие в конце каждой главы списка литературы, содержащего научные публикации как авторов данного издания, так и других исследователей, в том числе и зарубежных, который свидетельствует об объективности информации, представленной в монографии.

Книга «Вирусные болезни осетров и лососей» позволит студентам биологического и ветеринарного профилей, слушателям курсов повышения квалификации, а также специалистам, работающим в области ихтиопатологии, лучше понять проблемы и ознакомиться с современными методами лабораторной диагностики вирусных заболеваний осетров и лососей.

Считаю, что книга «Вирусные болезни осетров и лососей» (авторы Л. П. Бучацкий, Ю. П. Рудь, Н. Н. Матвиенко) должна быть рекомендована для специалистов государственной ветеринарной службы и органов ветеринарного надзора, а также сферы профессионального образования – от студентов до слушателей различных курсов повышения квалификации.

Проведение Всемирного дня борьбы с бешенством в России

Будимир Плавшич

Региональное представительство Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) в Москве, г. Москва, Россия; e-mail: b.plavsic@oie.int

В 2020-м году во многих странах мира представители международных организаций трехстороннего альянса – Всемирной организации здравоохранения животных, Всемирной организации здравоохранения и Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН – проведут информационную кампанию, посвященную Всемирному дню борьбы с бешенством, который с 2007 г. ежегодно отмечается международным сообществом 28 сентября.



В России Региональное представительство Всемирной организации здравоохранения животных в Москве совместно с национальными партнерами – ветеринарными и медицинскими ведомствами и научными институтами – организует мероприятия, посвященные Всемирному дню борьбы с бешенством. Главная их цель – укрепление многостороннего сотрудничества для достижения в России к 2030 году нулевого показателя смертности людей от бешенства после контакта с собаками, а в дальнейшем – полное искоренение данного заболевания в стране.

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире от бешенства погибает более

60 тысяч человек. Хотя данное заболевание характеризуется абсолютной летальностью, гибели людей в 100% случаев можно избежать. Для предотвращения передачи вируса из резервуара в дикой природе человеку прежде всего необходима вакцинация собак и кошек – животных, которые чаще всего заражают людей. Эффективность вакцинации доказана на практике, и ветеринарные специалисты во всем мире популяризируют важность антирабической иммунизации собак и кошек как для здоровья животных, так и для здоровья человека. Для искоренения бешенства на конкретной территории необходимо также проводить оральную вакцинацию диких животных. Таким образом, вакцинация животных вместе с популяризацией знаний об опасности инфекции, просветительской работой и системой по оказанию оперативной медицинской помощи людям, контактировавшим с больными животными, помогут спасти многие жизни.

Победить заболевание в каждой конкретной стране помогут последовательные и грамотные действия: создание и принятие четкой стратегии, разработка необходимых законодательных мер, скоординированные усилия всех участников. Такой комплексный подход эффективен для предотвращения и контроля и других зоонозных болезней, в том числе заболеваний с пандемическим потенциалом.

С 2015 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ), Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО) и Глобальный альянс по борьбе с бешенством (ГАББ) реализуют «Глобальный стратегический план по предотвращению гибели людей от бешенства, передающегося собаками, к 2030 году». План основан на концепции «Единое здоровье», которая отражает взаимосвязь здоровья человека, животных и состояния окружающей среды. Партнерство указанных выше организаций, названное «Объединенные против бешенства», позволяет консолидировать и усилить меры по борьбе с бешенством, которые принимаются научными

и другими компетентными организациями в разных государствах.

Международный опыт показывает, что для искоренения бешенства любой стране необходима стратегическая программа, основанная на следующих последовательных действиях:

1. *Просвещение, коммуникация и подготовка всех участников процесса к сотрудничеству и длительной работе по борьбе с болезнью.* Прежде всего, необходимо обеспечить готовность профильных ведомств и других участников процесса к активной работе по мониторингу, диагностике и искоренению заболевания. Это включает в том числе контроль численности популяции собак, программу по вакцинации домашних и оральная вакцинации диких животных. Также очень важна просветительская работа профессионалов с населением и администрацией населенных пунктов.

2. *Мониторинг и диагностика.* Оперативное оповещение о случаях бешенства чрезвычайно важно для предотвращения передачи вируса между животными и предупреждения распространения инфекции.

3. *Контроль и эрадикация болезни.* Математические модели и практический опыт некоторых стран доказывают, что вакцинация как минимум 70% популяции собак позволяет остановить передачу вируса между животными и от собак к человеку. Также широкомасштабная и долговременная программа по вакцинации диких животных на неблагополучных по заболеванию территориях может стать основой для постепенного искоренения бешенства в стране. Однако важно помнить: если соседние страны региона не принимают аналогичных мер, бешенство может быть вновь занесено на территорию государства. В связи с этим элиминация бешенства возможна, если все страны региона придерживаются одинаковой стратегии.

4. *Освобождение страны от бешенства.* В случае полного искоренения бешенства в стране возможно сокращение объемов оральной вакцинации диких животных при условии хорошо организованного контроля и системы раннего оповещения о случаях болезни среди животных.

ИНФОРМАЦИОННАЯ КАМПАНИЯ МЭБ

МЭБ приглашает присоединиться в социальных сетях к информационной кампании «Бешенство заканчивается здесь», которая призывает владельцев собак, заботящихся о своих питомцах, регулярно

прививать животных против бешенства. Для этого Всемирной организацией здравоохранения животных разработаны новые инструменты для коммуникации, доступные по ссылке <https://trello.com/b/66Bqv1ld/world-rabies-day-toolkit>.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Портал по бешенству на веб-платформе МЭБ: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal>

Техническая карточка МЭБ с описанием заболевания: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RABIES_FINAL.pdf

Программа МЭБ по контролю популяции собак: https://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmlfile=chapitre_aw_stray_dog.htm

Список центров МЭБ по сотрудничеству и референс-лабораторий по бешенству в Европе:

<https://rr-europe.oie.int/en/the-oie-reference-centres-reference-laboratories-and-collaborating-centres/collaborating-centres/?page-nb=1&1828=1920>

<https://rr-europe.oie.int/en/the-oie-reference-centres-reference-laboratories-and-collaborating-centres/reference-laboratories/?page-nb=1&1830=1966>

Список стран с самодекларируемым статусом по бешенству, опубликованный МЭБ:

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/Archives/ENG_archive_2000_Dec_2019.pdf

Глобальный стратегический план по предотвращению гибели людей от бешенства, передаваемого собаками, «Ноль к 2030»:

<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/action-plan/>

Страница ВОЗ по бешенству:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>

ВОЗ, ФАО и МЭБ объединяются в борьбе с бешенством:

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/FAO_OIE_WHO_Rabiesfactsheet.pdf



Онлайн-обучение помогает подготовить ветеринаров для борьбы с заразным узелковым дерматитом

**9 июля 2020 года,
Будапешт, Венгрия**

В обеспечении раннего выявления любых трансграничных болезней животных и быстрого реагирования на их распространение первостепенное значение имеет обучение как можно большего количества ветеринарных специалистов, способных оказать первую помощь животным. ФАО предлагает электронный обучающий четырехнедельный онлайн-курс подготовки к борьбе со вспышками заразного узелкового дерматита (ЗУД КРС).

Заразный узелковый (нодулярный) дерматит – это трансмиссивная болезнь крупного рогатого скота, в последние годы распространившаяся из Африки через страны Ближнего Востока и Турцию на территорию Балкан и России. В настоящее время заболевание регистрируется в странах с самым большим поголовьем скота в мире, таких как Бангладеш, Китай и Индия, угрожая и другим азиатским странам. Никогда раньше заразный узелковый дерматит не имел такого широкого географического распространения.

Эта болезнь приводит к значительным экономическим потерям, строгим торговым ограничениям, негативно влияет на доходы населения, занимающегося животноводством. Некоторые страны впервые сталкиваются с этой болезнью, это означает, что фермеры и ветеринарные службы пока не имеют опыта борьбы с данным заболеванием.

Ранее ФАО уже разработала стандартизированные учебные материалы (презентации, руководства и др.), которые можно легко перевести и адаптировать к специфике конкретной страны, а также быстро распространить среди государственных ветеринарных служб при помощи подготовки инструкторов (или каскадного обучения). Такой подход уже был успешно применен в Северной Македонии (2017), Беларуси, Молдове и на Украине (2018).

«Недавно мы поняли, что, даже если проводить тренинги по ЗУД КРС непрерывно, невозможно охватить всех желающих, поэтому, чтобы удовлетворить растущий спрос на обучение ветеринаров как из уже неблагополучных по заболеванию стран, так и из подверженных риску, было решено перейти на онлайн-формат», – рассказал специалист ФАО по охране здо-



Фото: ©ФАО Maxim Zmeyev

ровья животных Даниэль Белтран-Алкрудо. Он указал на очевидные преимущества онлайн-тренингов: для запуска нужно лишь стабильное подключение к Интернету; от организаторов не требуется больших затрат при увеличении желающих; онлайн-формат способен охватить людей из отдаленных местностей, позволяя им в дальнейшем обучаться в удобном для них темпе. Кроме того, во время связанных с пандемией COVID-19 ограничений на передвижения и очные мероприятия онлайн-тренинг более чем когда-либо подтверждает свою актуальность.

Нынешний пилотный курс был организован ФАО совместно с Европейской комиссией по борьбе с ящуром (EuFMD) под эгидой Глобального механизма для поэтапной борьбы с трансграничными болезнями животных (GF-TADs). Материалы курса были разработаны группой экспертов ФАО и Института Фридриха Леффлера (Германия).

Основная цель этого пилотного проекта – собрать отзывы экспертов для дальнейшего улучшения курса. В число участников вошли приглашенные представители ветеринарных служб из 44 стран – от Западной Европы до Восточной Азии. В нем также приняли участие представители международных агентств и производителей вакцин, а также эксперты по ЗУД КРС. Всего на курс записались 282 участника.

Запуск версии курса на русском языке запланирован на второе полугодие 2020 года.

О КУРСЕ

Десятичасовой обучающий курс состоит из шести учебных модулей по темам: характеристика заболевания, клиническая и патологоанатомическая диагностика, отбор проб и лабораторная диагностика, эпизоотология и расследование возникновения вспышек, надзор, а также контроль и ликвидация. Курс открывает вводный вебинар с краткой технической презентацией об обучении и инструкторах. Тренеры являются экспертами в области диагностики, эпизоотологии или контроля заболеваний. Каждый участник курса получает доступ к учебным материалам, дискуссионному форуму, записям вебинаров и списку дополнительных ресурсов.

Каждую неделю в течение всего периода обучения участники и тренеры будут обсуждать конкретную тему на дискуссионном форуме. Взаимодействию будут способствовать дополнительные вопросы от тренеров.

Курс завершится итоговым заданием и заключительным вебинаром, посвященным наиболее сложным или вызвавшим наибольшую дискуссию на форуме темам. Наконец, с помощью раздела обратной связи участники смогут оценить содержание курса и дать рекомендации по его дальнейшему улучшению.

ССЫЛКИ

Ветеринары с Балканского полуострова и из Восточной Европы обсуждают вопросы, касающиеся информирования о рисках болезней и управления их вспышками (на английском языке):

http://www.fao.org/europe/news/detail-news/en/c/1271970?utm_source=press%20release&utm_medium=email&utm_campaign=fao

Прогнозирование регионов в Евразии, подверженных риску заразного узелкового дерматита (ЗУД) (на английском языке):

http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/news_080219.html?utm_source=press%20release&utm_medium=email&utm_campaign=fao

Программа подготовки инструкторов для полевых ветеринаров по ЗУД в Молдове (на английском языке):

http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/news_080219.html?utm_source=press%20release&utm_medium=email&utm_campaign=fao

Каскадное обучение для готовности полевых ветеринаров в Восточной Европе к заражному узелковому дерматиту (ЗУД) (на английском языке):

http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/news_260618b.html?utm_source=press%20release&utm_medium=email&utm_campaign=fao

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ

Заразный узелковый дерматит. Практическое руководство для ветеринаров (на македонском, румынском, сербском, украинском, албанском, турецком, английском языках):

<http://www.fao.org/documents/card/en/c/1fc63b0-80e9-4f8e-825f-10ea6e998479/>

Изложение позиции ФАО по устойчивому предотвращению, контролю и ликвидации заразного узелкового дерматита в Восточной Европе и на Балканах (на английском языке):

<http://www.fao.org/3/a-i7827e.pdf>

Пространственный анализ заразного узелкового дерматита (ЗУД) в Евразии – прогнозирование областей в регионе, подверженных риску дальнейшего распространения заболевания (на английском языке):

<https://doi.org/10.1111/tbed.13090>

Редактируемые листовки для повышения осведомленности о приоритетных трансграничных болезнях животных (на английском языке):

http://www.fao.org/index.php?id=94206&utm_source=press%20release&utm_medium=email&utm_campaign=fao

В память о Виталии Александровиче Сергееве

14 июня 2020 г. ушел из жизни заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор Виталий Александрович Сергеев.

Виталий Александрович Сергеев родился в селе Буераки Сенгилеевского района Ульяновской области. Окончил с отличием Московскую ветеринарную академию (1945–1949), где начал свою научную деятельность, еще будучи студентом. Выполненная им в ту пору научная работа была удостоена премии Министерства высшего и среднего специального образования СССР и отмечена почетной грамотой.

С 1949 по 1956 г. В. А. Сергеев работал в области микробиологии во Всесоюзном институте экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ, Москва). С 1956 г. В. А. Сергеев начал заниматься вирусологией. С 1960 г. возглавлял лаборатории во ВНИИВВиМ (1960–1979), Институте медико-биологических проблем Минздрава СССР (1980–1981), ВИЭВ (1982–1989), Институте ветеринарной медицины г. Киева (1990–1993). С 1994 г. В. А. Сергеев – научный консультант НПО НАРВАК (г. Москва).

Профессор В. А. Сергеев является крупным ученым в области общей и ветеринарной вирусологии и специфической профилактики вирусных болезней животных, его имя широко известно отечественным и зарубежным специалистам. Он внес весомый вклад в теорию и практику нового научного направления – биотехнологию изготовления противовирусных препаратов – и заслуженно являлся признанным авторитетом в этой области науки.

Им предложен ряд оригинальных и ценных решений, защищенных 35 авторскими свидетельствами, отмеченных 4 золотыми, 3 серебряными и 1 бронзовой медалью ВДНХ СССР. Профессор В. А. Сергеев – автор более 350 научных работ. Итоги его многолетних исследований по культивированию клеток и вирусов, структуре и биологии вирусов обобщены в пяти монографиях: «Размножение вирусов животных в культуре ткани», «Репродукция и выращивание вирусов животных», «Структура и биология вирусов животных», «Культура клеток в ветеринарии и биотехнологии», «Вирусные вакцины». Две монографии, изданные в 1976 и 1983 гг., демонстрировались на международных книжных выставках-ярмарках и получили высокую оценку.

Под руководством профессора В. А. Сергеева выполнено 60 кандидатских и докторских диссертаций, создана научная школа высококвалифицированных специалистов в области общей и ветеринарной вирусологии. В. А. Сергеев награжден медалями «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.» и «За трудовую доблесть». Характерной чертой его научной деятельности является высокий научно-методический и организационный уровень,



целеустремленность, тесная связь с практикой, внедрение результатов научных исследований в народное хозяйство.

Виталий Александрович Сергеев останется навсегда в нашей памяти как великий ученый в области биотехнологии, разработчик средств специфической профилактики и методов диагностики болезней животных. Он был ярким примером ученого с неисчерпаемой энергией, грандиозными идеями, пропагандистом профессиональных достижений, базирующихся на обширных знаниях в сочетании с уникальными аналитическими способностями, стратегом в области теории и практики иммунопрофилактики инфекционных болезней животных, авторитетным наставником молодых специалистов, образцом взаимопомощи и взаимопонимания в среде коллег и соратников по профессии.

Вечная память талантливому ученому, уважаемому коллеге, светлому и доброму человеку – Виталию Александровичу Сергееву!

*Администрация,
сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ»*

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

Журнал «Ветеринария сегодня» приглашает авторов для публикации своих научных работ

- Редакция «Ветеринарии сегодня» (<http://veterinary.arriah.ru/jour/index>) рассмотрит возможность публикации ваших научных статей на страницах журнала. Наша миссия – представление основных направлений развития ветеринарной науки, привлечение внимания мировых научных сообществ к актуальным проблемам и инновационным разработкам в области ветеринарии, формирование и развитие единого мирового научного знания.
- Мы публикуем статьи как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работников ветеринарных учреждений для обмена опытом, обеспечения устойчивого ветеринарного благополучия и новых научных дискуссий.
- Журнал основан в 2012 г. на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ). Статьи публикуются на двух языках: русском и английском. Основными направлениями являются результаты теоретических и экспериментальных исследований в области ветеринарии и ветеринарной микробиологии, тенденций развития ветеринарной науки, обсуждение актуальных вопросов в области мониторинга и эпизоотологии болезней животных. 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 пт). 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 пт, 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 уместиться 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. Юрьево

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!



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

OIE REFERENCE LABORATORY FOR HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA
AND LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (POULTRY) AND NEWCASTLE DISEASE



Новая эффективная вакцина против бешенства разработана учеными Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Препарат предназначен для вакцинации сельскохозяйственных животных, а также кошек и собак.

- Вакцина индуцирует напряженный и стойкий иммунитет против бешенства через 21 сутки после применения. Уровень вируснейтрализующих антител при введении разработанной вакцины в два-три раза превышает уровень антител, индуцируемых сорбированными антирабическими препаратами.
- Вакцина «АРРИАХ-Рабивак» формирует у животных устойчивый иммунитет более чем на год.
- Вакцина обладает низкой реактогенностью, то есть не вызывает побочных эффектов. После введения препарата у всех видов животных, для которых он предназначен, не было выявлено признаков общей или местной реакции.
- Вакцину «АРРИАХ-Рабивак» рекомендовано применять для профилактики бешенства у сельскохозяйственных животных. Ученые подчеркивают, что мясо и молоко вакцинированных животных можно использовать без ограничений.
- Рекомендуемая доза при применении новой вакцины меньше по сравнению с сорбированными препаратами.

ВАКЦИНА АНТИРАБИЧЕСКАЯ ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬСИОННАЯ КУЛЬТУРАЛЬНАЯ «АРРИАХ-РАБИВАК»

Назначение:

Вакцина предназначена для профилактики и вынужденной иммунизации крупного и мелкого рогатого скота, свиней, лошадей, верблюдов, собак и кошек против бешенства.

Состав:

Лекарственная форма – эмульсия для инъекций. Вакцина изготовлена из инактивированного вируса бешенства, штамм «ВНИИЗЖ» (аналог штамма «Щелково-51»), полученного в суспензии клеток ВНК-21, инактивированного аминоэтилэтиленимином и эмульгированного в масляном адьюванте.

Биологические свойства:

Вакцина вызывает формирование иммунного ответа к вирусу бешенства через 21 сутки после однократного применения, иммунитет сохраняется в течение 12 месяцев.

Применение:

Запрещено вакцинировать животных, подозрительных по заболеванию бешенством.

Профилактическую иммунизацию животных против бешенства проводят однократно с последующей ревакцинацией через год. Крупный и мелкий рогатый скот, лошадей, свиней иммунизируют с 3-месячного возраста, собак и кошек – с 2-месячного.

Вынужденную вакцинацию проводят не позже 48 часов после возможного инфицирования животного. Вакцину вводят двукратно с интервалом в 7 суток в нижеуказанных дозах с соблюдением правил асептики и антисептики.

Перед применением флаконы с вакциной тщательно встряхивают. Место введения протирают 70%-м раствором этилового спирта.

Всем целевым видам животных вакцину вводят внутримышечно:

- лошадям, крупному рогатому скоту, верблюдам, свиньям – 2 см³;
- овцам, козам, собакам крупных и средних пород – 1 см³;
- кошкам, щенкам всех пород с 2-месячного возраста, а также взрослым собакам мелких пород – 0,5 см³.

Форма выпуска:

Вакцину расфасовывают в стеклянные или пластиковые флаконы по 1, 4, 10, 20, 50, 100 и 200 см³, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками.

Срок годности и условия хранения:

Срок годности вакцины – 24 месяца с момента изготовления при соблюдении условий хранения и транспортирования. Вакцина не должна применяться после истечения срока годности. Вакцину следует использовать в течение 10 часов после вскрытия флакона. Вакцину хранят и транспортируют в условиях низкой влажности при температуре от 2 до 8 °С в пределах срока годности. Допускается транспортирование вакцины в упаковке организации-производителя при температуре не выше 20 °С не более 5 суток. Замораживание вакцины не допускается.

Бешенство – острая инфекционная болезнь, вызываемая вирусом семейства Rhabdoviridae рода Lyssavirus. Заболевание приводит к специфическому энцефалиту (воспалению головного мозга) у животных и человека. Передается со слюной больного животного при укусе либо при попадании на поврежденные участки кожи или слизистые оболочки.

По вопросам приобретения ветеринарных препаратов производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» необходимо обращаться по телефонам 8(4922)52-99-24, 8(4922)26-15-25.