

Пчельников Александр Владимирович

Этиология, возрастная и сезонная динамика вирусных респираторных болезней  
телят в племенных хозяйствах

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ)

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации Юров Константин Павлович

Официальные оппоненты:

Мищенко Владимир Александрович, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпизоотологии и мониторинга Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Глотова Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный центр агробиотехнологии Российской академии наук (СФНЦА РАН)

Ведущая организация Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2017 г. в «\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 при ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел. (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЭВ и на сайте <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Ездакова Ирина Юрьевна

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### 1.1. Актуальность темы

Несмотря на усилия, которые были затрачены в разных странах мира на профилактику и борьбу с вирусными респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота, огромный объем знаний, накопленных по этому вопросу, разработанные методики диагностики и профилактики респираторных заболеваний, эта проблема и в настоящее время остается одной из наиболее актуальных для животноводства во многих странах мира.

Особая актуальность проблемы заключается в большом экономическом ущербе, который складывается из:

- недополучения приплода вследствие аборт и мертворождений (5-30%);
- рождения нежизнеспособных телят (около 10%);
- снижения удоя во время болезни (до 50-60%);
- гибели молодняка от серозной пневмонии (20%);
- недополучения привесов живой массы у молодняка (50-70%);
- увеличения на 30% коров с многократными неоплодотворенными осеменениями;
- снижения на 5-10% выхода телят на 100 коров;
- затрат на профилактику и лечение больных животных (Мищенко В.А., 2012, McKercher D.G., 1968).

Еще в 1973 Oxender, W.D. и др. установили, что пневмония различной этиологии является самой распространенной патологией молодняка крупного рогатого скота в США.

В 1976 году другой американский исследователь Jensen, R. установил, что 7% всех заболеваний молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 1 года составляют респираторные заболевания.

Willadsen, С.М. и др. в 1977 г. констатировали, что наиболее подвержены респираторным заболеваниям вирусной этиологии телята от рождения до 6 месячного возраста. В этот период около 26% всего поголовья телят подвержено респираторным заболеваниям, при этом летальность заболевания составляет 40%, а смертность – около 9%. По данным тех же исследований смертность от других заболеваний телят в этот же период составила 11%, а общая смертность телят в течение первых шести месяцев жизни – 20%.

Угроза острых вирусных болезней КРС для российского животноводства возникла в 60-е гг. прошлого века в связи с интенсивным завозом племенного скота из-за рубежа (Щербаков П.Н., 2000, Юров К.П., 1994). Импортированные животные часто были источником вирусов – возбудителей ИРТ/ИПВ, ВД-БС, ПГ-3 КРС и других инфекций (Осмаев И.А., 2007). Распространение этих возбудителей в неиммунном поголовье местного скота послужило причиной массовых вспышек респираторных инфекций с острым течением и высокой смертностью (Мищенко В.А., 2013).

Н.Н. Крюков и другие в 1968 г. установили участие герпесвирусов КРС в заболевании органов дыхания откормочного скота. И.П. Зотов с соавт. в 1969 г. впервые в СССР описал вирус ИРТ в период массовой вспышки респираторного заболевания телят. З.Ф. Зудилина с соавт. в 1970 г. сообщила о выделении вируса ПГ-3 крупного рогатого скота от больных бронхопневмонией телят.

Несмотря на постоянное обновление и расширение сведений о респираторных болезнях телят вирусной этиологии, эти инфекции по-прежнему составляют серьезную проблему для скотоводства всего мира.

Вследствие расширения торговых связей, изменения климата и других причин происходит распространение новых опасных инфекционных болезней животных и человека. Так в США на рубеже двух веков возникло ранее не наблюдавшееся на американском континенте заболевание – лихорадка Западного Нила. Серьезную проблему представляет зарегистрированная в Западной Европе в 2011 г. болезнь Шмаленберга и др. Наряду с этим появляются новые варианты возбудителей известных заболеваний: альфа- и гамма-герпесвирусных инфекций, вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота, гриппа лошадей (H3N8) и др. Включение в активную циркуляцию штаммов возбудителей, отличающихся по структуре генома, иммуногенности, вирулентности, отрицательно влияет на результативность профилактических мероприятий.

Герпес-, корона- и пестивирусным инфекциям свойственно значительное разнообразие характера течения и клинического проявления (Глотов А.Г., 2014).

Исследования советских ученых по разработке средств специфической профилактики вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота были успешными, однако в последующие годы прогресс в их исследованиях снизился. Причиной этому послужило усложнение эпизоотической обстановки по этим заболеваниям (Крюков Н.Н., 1975).

Живые рекомбинантные вакцины с делецией гена, кодирующего гликопротеин Е герпесвируса крупного рогатого скота типа 1, которые успешно применяют для профилактики инфекционного ринотрахеита, возбудителем которого является герпесвирус крупного рогатого скота 1 типа, не эффективны против герпесвирусной инфекции крупного рогатого скота типа 5. Хотя эти же вакцины используют поставщиками племенного скота для обязательной вакцинации при его импорте (Юров К.П., 2013).

Таким образом, выявление эпизоотически актуальных вирусов – возбудителей респираторных заболеваний крупного рогатого скота, изучение особенностей течения и проявления болезни, вирулентных свойств возбудителей является основой для совершенствования средств и методов борьбы с этими заболеваниями.

## **1.2. Цели и задачи**

Целью настоящей работы было изучение этиологии, особенностей возрастной и сезонной динамики респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота в племенных хозяйствах отдельных субъектов Российской Федерации.

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи:

1. Провести анализ распространенности герпесвируса крупного рогатого скота 1 типа на территории Российской Федерации и в мире.

2. Провести вирусологические, серологические и молекулярно-генетические исследования в нескольких типичных животноводческих хозяйствах для выяснения этиологии массовых респираторных заболеваний телят.

3. Идентифицировать возбудителей вирусных респираторных заболеваний телят, обнаруженных в период эпизоотических вспышек.

4. Изучить зависимость интенсивности эпизоотического процесса в неблагополучных по респираторным заболеваниям хозяйствах от возраста телят и сезона года.

5. Провести секвенирование генома и сравнительный филогенетический анализ выявленных возбудителей.

6. С учетом полученных результатов провести анализ рисков заноса вирусов – возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при импорте племенных животных из зарубежных стран.

7. Разработать рекомендации по диагностике массовых респираторных инфекций телят на основе современных молекулярно-генетических методов.

### **1.3. Научная новизна**

Проведен анализ рисков заноса вирусов – возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при ввозе племенных животных из зарубежных стран (на примере герпесвируса крупного рогатого скота 1 типа). Степень риска оценена как значительная.

Показана зависимость интенсивности эпизоотического процесса в неблагополучных по респираторным заболеваниям хозяйствах от возраста телят и сезона года. Экспериментально доказано участие новых (для Российской Федерации) герпесвирусов в эпизоотическом процессе при массовых респираторных болезнях телят.

Установлено включение в циркуляцию на территории России герпесвируса крупного рогатого скота 5 типа, отличающегося по фрагменту гена гликопротеина В, что позволяет дифференцировать вирусы герпеса крупного рогатого скота 1 и 5 типов по их иммуногенности.

Установлено на молекулярном уровне различие полевых штаммов значимых герпесвирусов крупного рогатого скота, циркулирующих на территории России в период с 2012 по 2016 годы.

Идентифицирован лимфотропный гаммагерпесвирус крупного рогатого скота, показано его значение в этиологии респираторной патологии телят.

### **1.4. Теоретическая значимость работы**

Определена роль некоторых новых (для Российской Федерации) герпесвирусов крупного рогатого скота в патогенезе массовых респираторных инфекций телят. Сравнительным филогенетическим анализом нескольких штаммов, герпесвируса крупного рогатого скота 1 типа, выделенных в разные годы, отмечена высокая консервативность участка генома, кодирующего гликопротеин В, в пределах генотипа.

Установлено включение в циркуляцию на территории России герпесвируса крупного рогатого скота 5 типа, отличающегося по фрагменту генома, кодирующего синтез гликопротеина В, что позволяет дифференцировать вирусы герпеса крупного рогатого скота 1 и 5 типов, создает теоретическую базу для интерпретации низкой эффективности вакцинопрофилактики герпесвирусной инфекции в ряде случаев.

В период острой вспышки респираторного заболевания телят идентифицирован лимфатропный гаммагерпесвирус крупного рогатого скота, получены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности

участия указанного вируса в этиопатогенезе респираторных заболеваний крупного рогатого скота.

### **1.5. Практическая значимость работы**

Используя элементы ГИС-технологий, проведен анализ распространения герпесвируса крупного рогатого скота 1 типа на территории Российской Федерации и в мире.

Проведен анализ рисков заноса вирусов – возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при ввозе племенных животных из зарубежных стран. Степень риска оценена как значительная.

Подготовлены «Рекомендации по дифференциальной диагностике возбудителей массовых респираторных заболеваний телят», которые могут быть использованы при разработке комплексных мероприятий по обеспечению готовности противодействия в случаях угрозы распространения злокачественной формы инфекции.

### **1.6. Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы были доложены на II Международной научно-практической конференции «Тенденции и инновации современной науки» (Краснодар, 2012 г.), V Международной научно-практической конференции «Тенденции и инновации современной науки» (Краснодар, 2013 г.), 8-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014 г.), межлабораторной методической комиссии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России в 2017 году.

### **1.7. Публикации научных исследований**

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

### **1.8. Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 118 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, их обсуждение, заключение, выводы и практические предложения; иллюстрирована 25 рисунками и 4 таблицами. Список использованной литературы включает 182 источника, в том числе 108 источников иностранных авторов.

Исследования по диссертации были выполнены в период с 2012 по 2016 гг. в лаборатории вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт

экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» Федерального агентства научных организаций Российской Федерации (ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России).

### **1.9. Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Анализ рисков заноса вирусов – возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при ввозе племенных животных из зарубежных стран. Степень риска оценена как значительная.

2. Результаты изучения этиологии нетипичных массовых респираторных болезней телят в хозяйствах Московской и Псковской областей.

3. Результаты исследований по выяснению этиологии массовых заболеваний телят и данные, полученные при филогенетическом анализе новых изолятов вирусов герпеса крупного рогатого скота 1 и 5 типов.

4. Данные исследования сезонной и возрастной динамики болезней крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах.

5. Результаты молекулярно-генетического исследования вспышки респираторного заболевания телят, типизации лимфотропного гаммагерпесвируса крупного рогатого скота и доказательства его роли в этиологии респираторной инфекции. Методами ПЦР, ОТ-ПЦР проведена дифференциальная диагностика от других вирусных инфекций – исключены в качестве возможных этиологических агентов герпесвирусы 1, 2, 3, 4 и 5 типов, а также возбудители вирусной диареи-болезни слизистых, парагриппа 3, респираторно-синцитиальной, адено- и короновirusной инфекций.

### **1.10. Личный вклад соискателя**

Соискатель принимал непосредственное участие в разработке и выполнении научных экспериментов, получении исходных данных, обработке и интерпретации экспериментальных данных, статистической и отчетной информации, критическом анализе литературы, разработке практических рекомендаций, участие в подготовке публикаций по выполненной работе.

Отдельные этапы работы выполнены совместно с сотрудниками лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России С.В. Алексеенковой и К.А. Диас Хименес и заведующим лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России А.А. Шабейкиным.



## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы**

#### **2.1.1. Культуры клеток**

Для размножения вирусов использовали перевиваемую линию клеток почки теленка MDBK из банка клеточных культур ФГБНУ ВИЭВ.

#### **2.1.2. Референтные и лабораторные штаммы вирусов**

В качестве положительного контроля использовали штаммы ТК и BGB-1 инфекционного ринотрахеита, штамм КЛ-2 коронавируса крупного рогатого скота и штамм ВК-1 вируса диареи крупного рогатого скота из музея отдела вирусологии ФГБНУ ВИЭВ.

#### **2.1.3. Отбор проб**

Исследования проводили в молочно-товарных животноводческих хозяйствах с примерно одинаковым количеством животных (1500-2000 голов), различающихся по степени эпизоотического благополучия, расположенных в Псковской области, а также в Люберецком, Подольском и Сергиево-Посадском районах Московской области.

Материал для исследования (пробы сыворотки крови и смывы со слизистой оболочки носовой полости) от здоровых и больных животных (коров, телят) отбирали ежеквартально с III квартала 2012 по II квартал 2016 года.

### **2.2. Методы исследования**

#### **2.2.1. Эпизоотологический анализ**

Анализ проводили на основании открытых данных, размещенных в сети Интернет на официальных сайтах Международного эпизоотического бюро (ОИЕ) (<http://www.oie.int/en/>), Евразийской экономической комиссии (<http://www.eurasiancommission.org/ru/Pages/default.aspx>), Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) (<http://www.fsvps.ru>), и материалов, предоставленных ФГБУ «Центр ветеринарии».

Построение нозологических карт было выполнено в лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России А.А. Шабейкиным в программе ArcGIS<sup>®</sup> for Desktop.

#### **2.2.2. Выделение и изучение возбудителей**

Суспензию культуры клеток почки теленка концентрацией 50-150 тыс. кл/мл рассеивали в пробирки, пластиковые флаконы различной емкости, пластиковые 96-, 48-, 24-луночные культуральные планшеты фирмы НОЙКЕМ

(Швейцария). Культивирование клеток проводили в среде Игла с 0,25% ГЛА производства фирмы НПО компания ПанЭко (Россия) с добавлением пенициллина по 100 ЕД/мл и стрептомицина по 100 мкг/мл. Культивирование проводили при температуре 37 °С без смены среды до формирования монослоя.

Перед заражением культуру клеток проверяли на отсутствие контаминации вирусом диареи крупного рогатого скота (Алексеевкова С.В., 2013).

Заражение культуры клеток проводили путем внесения исследуемого материала (суспензии органов, в которых мог содержаться вирус) или суспензии музейного вируса на монослой клеток в пластиковых флаконах и плашках, предварительно удалив использованную ростовую среду и дважды промыв клетки подогретым раствором Хенкса. После адсорбции клетками в течение 1 часа при температуре 37 °С монослой клеток двукратно отмывали раствором Хенкса и заливали поддерживающую безсывороточную среду. В опытах по накоплению культуральных вирусов рассчитывали множественность заражения 1,0-5,0 ТЦД<sub>50</sub>/мл на одну клетку. Для обеспечения указанной множественности заражения концентрат посевного вируса и поддерживающую среду смешивали в соотношении 1:30-1:50. Затем в культуральные сосуды добавляли среду ПСП без сыворотки и инкубировали в течение 45-96 часов при температуре 37 °С до получения характерного цитопатического действия вируса.

### **2.2.3. Реакция нейтрализации**

Для постановки реакции применяли стандартные 96 луночные культуральные планшеты.

Сыворотки крови крупного рогатого скота перед постановкой реакции прогревали на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 минут.

РН проводили микрометодом с двукратными разведениями сывороток и постоянной дозой вируса (100ТCD<sub>50</sub>/мл). В лунки культуральных планшет («Costar», США) вносили 0,03 мл сыворотки в двукратном разведении и равный объем вируса, инкубировали 1 час до внесения суспензии клеток MDBK (1 млн. клеток/ мл).

Планшеты с раститрованными сыворотками инкубировали при 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37 °С в термостате LabTech LCO-256AI производства фирмы Daihan LabTech CO., LTD (Корея).

Учет результатов реакции проводили на 3 сутки визуально, используя инвертированный микроскоп производства фирмы ОПТИКА (Италия). За титр

антител исследуемой сыворотки принимали наибольшее ее разведение, которое сдерживало развитие ЦПД вируса.

#### **2.2.4. Иммуноферментный анализ**

Для постановки реакции использовали Тест-системы для иммуноферментной диагностики инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота и иммуноферментной диагностики вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС) крупного рогатого скота, разработанные в 2003 г. сотрудниками лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России Г.К. Юровым и др.

Компоненты тест-систем для постановки иммуноферментного анализа были любезно предоставлены ведущим научным сотрудником лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России С.В. Алексеенковой.

Для проведения исследований использовали непрямой вариант твердофазного ИФА. Антигены (вирионы ИРТ-ИПВ и ВД-БС, очищенные ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы) адсорбировали на иммунологические планшеты по 100 мкл в лунку в 0,01 М фосфатном буфере с рН 8,0 в течение 12 часов. После адсорбции планшеты отмывали на приборе WellWash производства фирмы Thermo scientific (США) отмывочным раствором. В качестве отмывочного раствора использовали фосфатно-солевой буфер в присутствии 0,05% Твина – 20 (0,02 М фосфатном буфере рН 7,4, 170 мМ NaCl; 0,05 % Твина – 20).

Для постановки ИФА готовили ряд последовательных двукратных разведений сывороток в фосфатно-солевом буфере с добавлением Твина – 20. Реакцию проводили в объеме 100 мкл.

Сыворотки крови телят и взрослого крупного рогатого скота раститровывали с начальным разведением 1:400.

Планшеты с раститрованными сыворотками инкубировали в течение 2-х часов при комнатной температуре.

После инкубации проводили отмывку планшет на приборе WellWash производства фирмы Thermo scientific (США).

В отмытые планшеты добавляли иммунопероксидазный конъюгат в разведении 1:10 000 (по 100 мкл), и инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 37 °С, после чего снова проводили отмывку планшет. Использовали специфический иммунопероксидазный конъюгат против иммуноглобулинов КРС.

В качестве субстратной смеси использовали коммерческий препарат «ТМБ» на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина («Биолаб», Россия). Окраску субстратной смесью проводили по протоколу фирмы – изготовителя.

Учет реакции проводили на приборе STAT FAX 4300 (CHROMATE), производства фирмы AWARENESS TECHNOLOGY (США) при длине волны 450 нм. Положительными считали пробы, коэффициент оптического поглощения которых, начиная с разведения 1:400 в 2 раза и более превышал коэффициент оптического поглощения отрицательного контроля, но при этом был не ниже 0,200 оптических единиц (о.е.). Уровень оптической плотности менее 0,150 о.е. принимали за отрицательный результат. Образцы с оптической плотностью в диапазоне от 0,150 до 0,200 признавали сомнительными и проверяли повторно.

Результаты ИФА обрабатывали при помощи программы Microsoft Office Excel 2007. Оценку результатов проводили по коэффициенту S/N – отношению значений оптической плотности исследуемой пробы (S) к отрицательному контролю (N).

#### **2.2.5. Реакция торможения гемагглютинации для обнаружения антител к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота**

Для постановки реакции использовали Набор для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота в реакции торможения гемагглютинации РТГА (ТУ-10-19-84-89) производства ООО «Агровет» (Москва). Постановку реакции проводили по протоколу, рекомендованному производителем.

Для реакции использовали микропланшеты.

#### **2.2.6. Определение титра антител к коронавирусу КРС**

Определение титра антител к коронавирусу крупного рогатого скота выполнено сотрудниками лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России Л.А. Мниковой и Т.А. Ишковой.

#### **2.2.7. Полимеразная цепная реакция**

Методом полимеразной цепной реакции проводили исследования биологического материала (смывы со слизистой оболочки носовой полости телят с клиническими признаками респираторных заболеваний). Исследования проводили на вирусные инфекции:

- герпесвирус 1 типа;
- злокачественную катаральную лихорадку;
- язвенный маммит;
- герпесвирус 4 типа;

- герпесвирус 5 типа;
- лимфотропный гаммагерпесвирус;
- вирусную диарею;
- парагрипп-3;
- респираторно-синцитиальную инфекцию;
- аденовирус-3 и короновиральную инфекцию.

Для экстракции вирусной ДНК из биологического материала использовали коммерческий набор «Quick-gDNA MiniPrep» («Zymo Research», США), для выделения РНК – «Комплект реагентов для выделения тотальной РНК из цельной крови, клеточных культур и образцов тканей» («Синтол», Россия).

Экстракцию ДНК и РНК проводили в соответствии с рекомендациями производителей наборов.

Реакцию обратной транскрипции проводили, используя коммерческий набор фирмы «Синтол» по схеме, рекомендованной производителем.

Праймеры и режимы амплификации подбирали в соответствии с опубликованными в литературе рекомендациями (Юров К.П., 2013, Collins James K., 2000, Horwood P.F., 2008, Ka'ima'n D., 2005, Lahijani Roya S., 1994, Larsen L.E., 1999, Lopez O. J., 1991, Mastri S.A., 1996, Zhu Y.M., 2011).

При исследовании биологического материала на наличие генетического материала герпесвирусов крупного рогатого скота в реакционную смесь добавляли 5% DMSO и применяли технологию Hot Start. Для предварительного прогревания реакционной смеси использовали термостат фирмы ДНК-технология (Россия).

Амплификацию проводили в твердотельном амплификаторе фирмы ДНК-технология (Россия).

Результаты реакции учитывали путем электрофореза амплифицированной ДНК в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением бромида этидия в трис-боратном буферном растворе.

Детекцию результатов проводили на трансиллюминаторе фирмы Vilber Lourmat (Франция) при длине волны 312 нм.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили сотрудники ЗАО «Постгеномные и нанотехнологические инновации» Т.А. Акопян и др.

Полученные результаты анализировали с помощью компьютерной программы «FASTA», разработанной Европейским институтом биоинформатики.

Филогенетический анализ проводили с помощью программы ClustalX. Построение дендрограмм выполнено совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ ФАНО России С.В. Алексеенковой в программе MEGA6.

## **2.3. Результаты собственных исследований**

### **2.3.1. Мониторинг герпесвирусной инфекции 1 крупного рогатого в России и зарубежных странах.**

Для оценки распространенности инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, нами проанализированы данные ежегодной ветеринарной отчетности, предоставленные ФГБУ «Центр ветеринарии» с 2004 по 2015 годы включительно. Выбраны три временных периода: 2004-2007, 2008-2011 и 2012-2015 годы. Сводная информация за указанные периоды обобщена и статистически обработана при помощи программы Microsoft Office Excel 2007. На основании полученной сводной информации с использованием ГИС-технологий построены карты.

При анализе приведенных карт, нами установлено, что вирус на территории страны встречается повсеместно, но чаще всего заболевания крупного рогатого скота ИРТ регистрируются в границах двух основных ареалов распространения вируса, которые условно можно назвать Европейский и Азиатский. При этом на протяжении изучаемого периода (12 лет) Азиатский ареал характеризуется относительной стабильностью, а Европейский имеет тенденцию к смещению.

Изучение динамики изменения эпизоотической ситуации по ИРТ в мире с 2012 г. по 2014 г. включительно проводили с использованием материалов информационной базы данных OIE – WAHID. Нами установлено, что эпизоотическая обстановка по ИРТ в мире характеризуется стабильностью. За последние три года в МЭБ поступило только 2 сообщения о регистрации заболевания в ранее благополучных странах (Ирландия 2012 г. и 2013 г. – 2 эпизоотических очага). В 2014 и 2015 гг. ни одна страна отчеты о регистрации новых очагов заболевания в OIE не отправляла.

Вирус ИРТ распространен практически во всех странах мира, за исключением Африканского континента.

При анализе эпизоотической ситуации по ИРТ на территории Европы установлено, что по итогам 2014 года благополучными по этому заболеванию официально признаны: Норвегия, Швеция, Финляндия, Литва, Молдавия, Болгария, Греция, Словакия, Италия, Румыния и Чешская Республика.

Это заключение подтверждается данными В.А. Мищенко (2012 год).

Чтобы провести оценку угрозы рисков заноса герпесвирусов крупного рогатого скота на территорию Российской Федерации при ввозе племенного скота, проанализированы объемы импорта крупного рогатого скота в Россию за последние 5 лет (2011-2015 гг.).

В работе использовали отчетные данные ФГБУ «Центр ветеринарии».

Установлено, что в период с 2012 г. по 2015 г. включительно на территорию Российской Федерации было ввезено 328 225 голов крупного рогатого скота из 22 стран мира.

Анализ доли импорта отдельных стран показывает, что основными экспортерами крупного рогатого скота в Россию являются США (43,8%) и Австралия (28,8%). На долю стран Европейского союза суммарно приходится около 25,6% от всего экспорта в Российскую Федерацию.

Для оценки угрозы рисков заноса герпесвируса 1 типа крупного рогатого скота на территорию Российской Федерации при ввозе племенного скота мы наложили основные регионы экспорта на карты эпизоотической ситуации по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота.

В результате нами установлено, что большинство стран-экспортеров (за исключением Австрии, Дании, Словакии, Финляндии и Швеции) в течение всего прослеживаемого периода (2012-2014 гг.) в течение всего прослеживаемого периода (2012-2014 гг.) неблагополучны по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота.

### **2.3.2. Результаты диагностических исследований на основе молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция)**

Для идентификации вирусов – возбудителей респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота проводили молекулярно-генетические исследования в племенных хозяйствах, расположенных в Московской и Псковской областях.

В результате исследований в клиническом материале нами были обнаружены фрагменты генома коронавируса и герпесвируса типа 5.

По нашим наблюдениям, использование технологии горячего старта позволяет повысить выход продукта реакции при выявлении герпесвирусов крупного рогатого скота.

Сравнительный анализ с помощью программы FASTA нуклеотидной последовательности гена гликопротеина S изолята коронавируса крупного

рогатого скота и референтных штаммов, зарегистрированных в INSD, показал его сходство с эпизоотическими штаммами коронавируса диких жвачных, выделенными в 1994 г. в США при исследовании фекалий оленей Самбара и водяных козлов. Гомология выравнивания первичной структуры генома составила 96,9%.

Позицию расшифрованных нуклеотидов в геноме выявленного изолята определяли относительно полноразмерной копии генома (13016 пн) референтного штамма коронавируса крупного рогатого скота R-AN65 (EF424617) [Кудрявцев В.А., 2002].

При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности изолятов и штаммов альфагерпесвирусов крупного рогатого скота, зарегистрированных в INSD, установлено их сходство с эпизоотическими штаммами герпесвируса крупного рогатого скота типа 5: SV507/99 (AY261359); N565 (AF091605); а также герпесвируса буйволов типа 1 – Buffalo (AF359760), выделенными в 1999 г. в Бразилии и Швеции от телят с менингоэнцефалитом. Гомология выравнивания первичной структуры генома опытных полевых изолятов и референтных штаммов герпесвируса крупного рогатого скота типа 5 и герпесвируса буйволов типа 1 составила 99,4-98,1 и 98,6-97,8% соответственно. Позиция расшифрованных нуклеотидов в геноме исследуемых изолятов нами определялась относительно полноразмерной копии генома (138390 пн) референтного штамма герпесвируса типа 5 крупного рогатого скота SV507/99 (AY261359).

### **2.3.3. Сравнительное изучение полевых и лабораторных изолятов герпесвирусов крупного рогатого скота методом филогенетического анализа.**

Учитывая большое разнообразие представителей семейства Herpesviridae, мы предположили возможное генетическое различие герпесвирусов, находящихся в активной циркуляции в обследуемых нами животноводческих хозяйствах, с известными вакцинными штаммами, что могло служить причиной неудовлетворительных результатов вакцинопрофилактики заболевания.

Для подтверждения данного предположения проводили филогенетический анализ структуры генетического кода выявленных нами изолятов и музейных штаммов вируса из коллекции ФГБНУ ВИЭВ.

В исследовании использовали следующие музейные штаммы вируса ИРТ:

- ТК пассаж 7 ПЭК – 77 – выделен в 1977 году;
- ТК пассаж 8 ПЭК – 77 – выделен в 1977 году;
- BGB-1 – 2006 – выделен в 2006 году.



Для размножения вирусов использовали первичную культуру клеток почки эмбриона коровы (ПЭК), перевиваемые линии клеток из банка клеточных культур ФГБНУ «ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко».

Предварительно культуру молекулярно-генетическим методом проверяли на отсутствие контаминации вирусами и микоплазмами (Алексеев С.В., 2013).

Результаты секвенирования выделенных генетических материалов вирусов были проанализированы с помощью программы «FASTA».

Последовательности нуклеотидов музейных штаммов вируса были сравнены с таковыми референтных штаммов из международной базы данных INSD, в результате музейные штаммы вируса ИРТ нами были идентифицированы как:

– ТК пассаж 7 ПЭК – 77 – Bovine herpesvirus type 1.2 сходство первичной генетической структуры на 99% со штаммом SP1777, выделенным в Оклахоме (США) в 2009 году;

– ТК пассаж 8 ПЭК – 77 – Bovine herpesvirus type 1.2 сходство первичной генетической структуры на 99% со штаммом SP1777, выделенным в Оклахоме (США) в 2009 году;

– BGV-1 – 2006 – Bovine herpesvirus type 5 сходство первичной генетической структуры на 97% со штаммом SV507/99, выделенным в Бразилии в 1999 году.

Полученные нуклеотидные последовательности, после идентификации музейных штаммов вируса ИРТ, использовали для филогенетического анализа.

Для удобства оценки филогенетического родства музейных штаммов вируса с полевыми штаммами, выделенными в ходе наших исследований, и референтными штаммами мы построили дендрограмму, отражающую степень филогенетического родства, основанного на анализе нуклеотидной последовательности гена гликопротеина В (рисунок 1).

В результате мы убедились в отсутствии значительных изменений в генетическом материале изучаемых вирусов в рамках гена, ответственного за синтез гликопротеина В.

**Дендрограмма, отражающая степень филогенетического родства российских эпизоотических изолятов и референтных штаммов альфагерпесвирусов крупного рогатого скота, основанного на анализе нуклеотидной последовательности гена гликопротеина В**



### 2.3.4. Клинико-эпизоотологические исследования в хозяйствах Московской области

Исследования проводились в молочно-товарных хозяйствах с разной эпизоотической обстановкой по респираторным болезням телят, расположенных в Люберецком, Подольском и Сергиево-Посадском районах Московской области.

Во всех обследуемых хозяйствах воспроизводство стада проводится за счет собственного ремонтного молодняка. Ввоз животных из-за рубежа или других хозяйствующих субъектов Российской Федерации не проводился в течение последних 15-20 лет. На основании указанных данных нами было сделано

предположение, что в этих хозяйствах циркулирует устоявшийся круг возбудителей и занос новых возбудителей маловероятен.

Хозяйство 1. Болезни органов дыхания у телят и аборт у коров наблюдают в виде спорадических случаев. Против респираторных и кишечных заболеваний молодняк не вакцинируют. Отел коров проходит в специализированном родильном отделении в индивидуальных боксах. Телят до 5-дневного возраста содержат в боксах (со 2-го дня – по 3-5 голов в боксе) Телят старше 5-дневного возраста переводят в телятник с групповым содержанием. Помещение телятника – сухое, оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, отсутствуют сквозняки.

В единичных случаях у телят регистрируются субфебрильная температура, ринит и кашель.

Хозяйство 2. Ежегодно регистрируют заболевания органов дыхания молодняка КРС. Телята с рождения до 6-месячного возраста содержатся в сыром помещении. Крыша протекает, стены внутри влажные, оконные проемы затянуты пленкой. В навозных желобах стоит вода. Вентиляция смешанного типа: приточная – пассивная (каналы в основном заделаны кирпичной кладкой), вытяжная – активная – электрические вентиляторы (большую часть года выключены). Вследствие этого у телят в возрасте 2-4 месяца ежегодно в осенне-зимний период обостряются и приобретают массовый характер болезни органов дыхания. У больных телят в ранний постнатальный период отмечали вялость, невысокую лихорадку, ринит, конъюнктивит, задержку роста. При переводе их в группу доращивания регистрировались массовые вспышки острой респираторной инфекции. У коров и телок диагностировали вульвовагиниты, однако аборты не наблюдали.

Стельных и сухостойных коров вакцинируют против комплекса возбудителей респираторно-кишечных заболеваний телят.

Хозяйство 3. В течение нескольких лет сохраняется статус благополучного по массовым заболеваниям органов дыхания телят. За последний год в осенне-зимний период зарегистрирована вспышка абортов у коров и заболеваний органов дыхания у телят невыясненной этиологии. Вспышка повторилась в более доброкачественной форме в начале лета 2013 года. Болели телята 2-6 месяцев с симптомами кашля, ринита, повышенной температурой тела. Профилактическая вакцинация глубокостельных коров против комплекса респираторных и кишечных заболеваний молодняка не проводится.

Первая вспышка заболевания характеризовалась массовым охватом поголовья телят. У животных отмечался сухой прерывистый кашель, который усиливался после небольшой физической нагрузки. При этом повышения температуры тела у больных животных зарегистрировано не было или лихорадка имела субфебрильный характер. Истечения из носа отсутствовали.

У коров в этот период увеличилось количество абортос.

Повторная вспышка заболевания характеризовалась меньшим охватом поголовья и более стертым (бессимптомным) течением.

### **2.3.5. Сезонная динамика вспышек респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота в нескольких типичных хозяйствах Московской области**

Анализ сезонной динамики титров вирусспецифических антител проводили методом ИФА.

При анализе полученных результатов отмечено, что в хозяйствах 1 и 3 в осенний период наблюдается высокий титр антител против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. В течение последующего периода наблюдений происходит значительное снижение уровня антител и в летние месяцы (второй квартал 2013 г.) их титр значительно ниже. Титр антител к вирусной диарее крупного рогатого скота в указанных хозяйствах не достигает диагностических значений в течение всего периода наблюдений.

В хозяйстве 2 в весенне-осенний период происходит резкое нарастание титра антител к возбудителю вирусной диареи крупного рогатого скота, титры антител к вирусу инфекционного ринотрахеита достигают диагностических значений в весенне-летний период (III квартал 2012 г. и II квартал 2013 г.).

### **2.3.6. Иммунная реакция телят на вирус парагриппа-3.**

По результатам серологического исследования проанализировали полученные значения средних значений титров вирусспецифических антител у телят. В результате установлено следующее.

В хозяйстве 1 средний титр антител к парагриппу-3 КРС в течение года находится практически на одном уровне, не достигая при этом диагностического значения.

В хозяйстве 2 пик антител к вирусу ПГ-3 наблюдается в I и IV квартале 2013 года.

В хозяйстве 3 в первом квартале 2013 года средний уровень антител низкий и не достигает диагностических значений. В последующие кварталы наблюдается

постепенное увеличение значения среднего титра антител, что указывает на высокий уровень защиты животных.

При молекулярно-генетических исследованиях вирус ПГ-3 КРС не был выделен ни в одном из обследуемых хозяйств.

### **2.3.7. Изучение этиологии массовых вспышек респираторных инфекций телят в нескольких хозяйствах Московской области по результатам молекулярно-генетических исследований**

Результаты серологических исследований в трех обследуемых хозяйствах Московской области подтверждали молекулярно-генетическими исследованиями, результаты которых обобщили в виде таблицы (таблица 1).

В изолятах, полученных в хозяйствах 1 и 3, на основании анализа нуклеотидной последовательности генома, был идентифицирован герпесвирус КРС 1-го типа (возбудитель ИРТ). В хозяйстве 1 также идентифицирован герпесвирус КРС 5-го типа.

### **2.3.8. Обнаружение лимфотропного гамма-герпесвируса крупного рогатого скота**

Молекулярно-генетическими исследованиями в хозяйстве 3 во время повторной вспышки заболевания, был выявлен нетипичный для респираторной инфекции возбудитель – лимфотропный гамма-герпесвирус КРС (таблица 1).

Данный возбудитель ранее не был зарегистрирован на территории Российской Федерации

Сравнительный анализ последовательности нуклеотидов исследуемого вируса с таковыми референтных штаммов из международной базы данных INSD выявил сходство первичной структуры участка генома на 98% с канадскими штаммами лимфотропного гамма-герпесвируса крупного рогатого скота из провинции Квебек (рисунок 2).

## **3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате исследований, проведенных нами в нескольких племенных хозяйствах, завозивших племенной крупный рогатый скот из-за рубежа в последнее время, выделен герпесвирус 5 типа. Возможно, что вирус является одним из ведущих этиологических факторов массовых инфекций животных в странах, экспортирующих племенной скот и продукты животноводства в Российскую Федерацию. Однако в соответствующих отечественных публикациях, в том числе известных авторов (Глотов и соавт., Мищенко и соавт.

и др.) мы не обнаружили сообщений о регистрации этого возбудителя на территории страны.

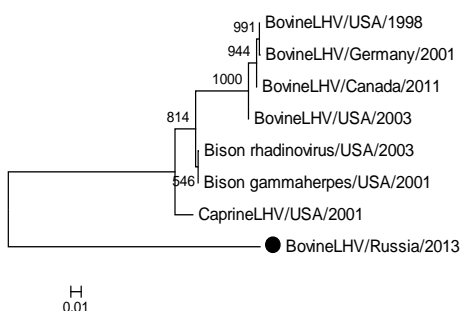
Таблица 1

**Результаты исследования в ПЦР и ОТ-ПЦР клинического и патологического материала от телят с респираторной патологией в хозяйствах Московской области**

Исследуемые вирусы	Гены-мишени, кодирующие полипептиды:	Результаты по хозяйствам		
		Хозяйство 1	Хозяйство 2	Хозяйство 3
Герпесвирус КРС типа 1	Гликопротеин В	<b><u>положительный</u></b>	отрицательный	<b><u>положительный</u></b>
Герпесвирус КРС типа 5	То же	<b><u>положительный</u></b>	отрицательный	отрицательный
Герпесвирус КРС типа 4	»	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Герпесвирус КРС типа 2	»	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Аденовирус КРС типа 3	Протеин DBP	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Коронавирус КРС	Гликопротеин S	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Герпесвирус коровьих антилоп типа 1 (вирус катаральной горячки)	Гликопротеин В	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Лимфотропный гаммагерпесвирус КРС	ДНК-полимераза	отрицательный	отрицательный	<b><u>положительный</u></b>
Респираторно-синцитиальный вирус	Протеин F	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Вирус ПГ-3 КРС	Протеин М	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Вирус ВД-БС КРС	Протеин NS3	отрицательный	отрицательный	отрицательный

Рисунок 2

**Дендрограмма, отражающая степень филогенетического родства между эпизоотическим вирусом и референтными штаммами лимфотропного гамма-герпесвируса крупного рогатого скота, основанного на анализе нуклеотидной последовательности на участке генома, кодирующего вирусную ДНК-полимеразу**



При оценке угрозы риска заноса возбудителя ИРТ в Россию установлено, что большинство стран-экспортеров (за исключением Австрии, Дании, Словакии, Финляндии и Швеции – суммарно 8,7% от всех ввезенных животных) в течение всего прослеживаемого периода (2011-2014 гг.) неблагополучны по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота, которое наносит большой экономический ущерб животноводству этих стран. В связи с этим полученные нами данные могут быть использованы при разработке правил противодействия дальнейшему распространению герпесвируса крупного рогатого скота 5 типа.

Методами молекулярно-генетических исследований идентифицирован геном лимфотропного гамма-герпесвируса крупного рогатого скота. Литературных данных об участии этого вируса в патологии органов дыхания на территории России нами не обнаружено. Ряд зарубежных исследователей (J. Rovnak et al., 1998, Carl A. Gagnon et al., 2010) считает, что вирус может рассматриваться, как кофактор в патогенезе энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. Однако наши исследования указывают на возможность ведущей роли лимфотропного гамма-герпесвируса в этиологии респираторных заболеваний телят, в ряде случаев.

#### **4. ВЫВОДЫ**

1. На основе литературных данных, материалов, размещенных в открытом доступе на сайте Международного эпизоотического бюро, а также по результатам статистической обработки данных ежегодной ветеринарной отчетности, предоставленных ФГБУ «Центр ветеринарии», используя элементы ГИС технологии, проведен анализ распространенности герпесвируса крупного рогатого скота 1 типа на территории Российской Федерации и в мире.

2. При вирусологических, серологических и молекулярно-генетических исследованиях в нескольких типичных животноводческих хозяйствах обнаружены респираторные вирусы крупного рогатого скота, не регистрировавшиеся на территории Российской Федерации, в том числе альфа-герпесвирус крупного рогатого скота 5-типа (BoHV-5) иммунологически родственный, но не идентичный возбудителю ИРТ (BoHV-1) и лимфотропный гамма-герпесвирус крупного рогатого скота. Показано участие лимфотропного гамма-герпесвируса крупного рогатого скота в этиологии респираторных заболеваний телят, при этом исключены (методами ПЦР, ОТ-ПЦР) герпесвирусы 1, 2, 3, 4 и 5 типов, а также возбудители вирусной диареи-болезни слизистых, парагриппа 3, респираторно-синцитиальной, адено- и короновirusной инфекций.

3. Проведен сравнительный филогенетический анализ выявленных в хозяйствах Московской и Псковской областей эпизоотических изолятов и музейных штаммов герпесвирусов крупного рогатого скота. Отмечено отсутствие значимых изменений в консервативном участке генома, кодирующего гликопротеин В, штаммов герпесвируса крупного рогатого скота 1 типа (BoHV-1) циркулировавших ранее.

4. Отмечена зависимость интенсивности эпизоотического процесса в неблагополучных по респираторным заболеваниям хозяйствах от возраста телят и сезона года.

5. Филогенетический анализ консервативных участков генома, кодирующих гликопротеин В эпизоотических изолятов и референтных штаммов герпесвирусов крупного рогатого скота 1 и 5 типа, подтвердил консервативность участка генома ответственного за синтез гликопротеина В данных вирусов.

6. С учетом полученных результатов проведен анализ рисков заноса вирусов – возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при ввозе племенных животных из зарубежных стран. Степень риска оценена как высокая.

## **5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. При планировании ввоза крупного рогатого скота из-за рубежа необходимо учитывать эпизоотический статус страны-экспортера не только по инфекционному ринотрахеиту крупного рогатого скота, но и по остальным герпесвирусным инфекциям.

2. Проводить исследование крупного рогатого скота, ввезенного на территорию Российской Федерации из зарубежных стран, в период 30 дневного карантина на герпесвирусные инфекции, независимо от его статуса вакцинации против инфекционного ринотрахеита.

3. Массовые обработки крупного рогатого скота в хозяйствах проводить с учетом сезонности респираторных заболеваний молодняка.

4. Для профилактики герпесвирусных заболеваний крупного рогатого скота можно применять уже разработанные отечественной и зарубежной промышленностью иммунобиологические препараты, зарегистрированные установленным порядком на территории России, без обновления их антигенного состава.

5. При лабораторном подтверждении диагноза на инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота проводить дифференциальную



лабораторную диагностику возбудителя инфекции (BoHV-1, BoHV-5). Для дифференциальной диагностики можно использовать разработанные нами Методические рекомендации по молекулярной диагностике альфа-герпесвирусных инфекций крупного рогатого скота 1 и 5 типа.

## **6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Пчельников А.В., Алексеенкова С.В., Диас Хименес К.А., Юров К.П. Некоторые результаты изучения этиологии респираторных болезней телят в хозяйствах Московской области // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2015. № 1. С. 16-18.

2. Пчельников А.В., Алексеенкова С.В., Гулюкин М.И., Степанова Т.В., Юров К.П. Применение методов молекулярной диагностики для выявления и идентификации лимфотропного гаммагерпесвируса крупного рогатого скота – кофактора энзоотического лейкоза // В сборнике: Молек. диагностика – 2014. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2014. С. 497-498.

3. Юров К.П., Алексеенкова С.В., Пчельников А.В. Идентификация лимфотропного гаммагерпесвируса крупного рогатого скота в носовых секретах больных телят // В сборнике: Теория и практика актуальных исследований. Материалы V Международной научно-практической конференции. 2013. С. 198-200.

4. Юров К.П., Алексеенкова С.В., Пчельников А.В., Мникова Л.А., Ишкова Т.А., Юров Г.К. Современный подход к диагностике респираторных инфекций крупного рогатого скота, вызываемых корона и герпесвирусами // Ветеринария. 2013. № 8. С. 23-29.

5. Юров К.П., Алексеенкова С.В., Пчельников А.В., Юров Г.К. Диагностика и контроль вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота в условиях современного животноводства // В книге: Тенденции и инновации современной науки. Материалы II Международной научно-практической конференции. 2012. С. 66.