МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И.СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РАН»

АССОЦИАЦИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ И НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ ПО КООРДИНАЦИИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ И НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ОТРАСЛЯХ «ВЕТЕРИНАРИЯ, ЗООТЕХНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ»

ТРУДЫ ВИЭВ

ТОМ 80

Часть I

Trudi VIEV tom 80 thast 1

Москва, 2018 г.

УДК 619:616.98:578.828.11
ISBN 978-5-9906389-7-6
DOI 10.30917/ATT-PRINT-2018-1

Труды ВИЭВ, том 80 часть 1. Представлены материалы юбилейной Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня создания ВИЭВ «Здоровье животных: современные научные подходы, направления, тенденции».

Москва, 22-23 ноября 2018 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Гулюкин М.И., академик РАН, профессор, доктор ветеринарных наук (главный редактор);
Смирнов А.М., академик РАН, профессор, доктор ветеринарных наук (зам. главного редактора);
Успенский А.В. член-корр. РАН, профессор, доктор ветеринарных наук (зам. главного редактора);
Забережный А.Д., доктор биологических наук, профессор (зам. главного редактора);
Алипер Т.И., доктор биологических наук, профессор;
Ездакова И.Ю., доктор биологических наук;
Искандаров М.И., доктор ветеринарных наук;
Найманов А.Х., доктор ветеринарных наук, профессор;
Савченкова И.П., доктор биологических наук, профессор;
Юров К.П., доктор ветеринарных наук, профессор;
Белименко В.В., кандидат биологических наук (председатель Совета молодых ученых и специалистов ФГБНУ ВИЭВ);
Величко Г.Н., кандидат биологических наук,
Дроздова Е.И., кандидат биологических наук;
Завьялова Е.А., кандидат биологических наук;
Исаев Ю.Г., кандидат биологических наук;
Капустин А.В., кандидат ветеринарных наук,
Кучерук О.Д., кандидат биологических наук;
Сотников А.Н., кандидат биологических наук;
Степанова Т.В., старший научный сотрудник ООиКНИР;
Шуляк А.Ф., кандидат ветеринарных наук,
Храменков В.А.,
(главный редактор журнала «Ветеринария и кормление»)

Ответственный за выпуск А.М. Гулюкин

Труды ВИЭВ, том 80 часть 1.
ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН»

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, 2018 г.

СОДЕРЖАНИЕ

120 ЛЕТ ВСЕРОССИЙСКОМУ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОМУ ИНСТИТУТУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ Я.Р. КОВАЛЕНКО
М.И. ГУЛЮКИН **…….. 12**

СИСТЕМНЫЙ КОНТРОЛЬ РАСПРОСТРАНЕННЫХ И ЭМЕРДЖЕНТНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЛОШАДЕЙ
Юров К.П., Алексеенкова С.В., Мникова Л.А., Ишкова Т.А. …….. 37

ПРЯМОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА
Анисина О.В., Клюкина В.И., Святенко М.С. ……..…….. 47

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КОКЦИДИОЗА СВИНЕЙ В СМОЛЕНСКОЙ И НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТЯХ И МЕРЫ БОРЬБЫ С НИМ
Арисов М. В., Поселов Д.С., Семенова Н.В. ……..….. 55

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ПРИ КОКЦИДИОЗЕ СВИНЕЙ
Арисов М.В., Поселов Д.С. ……..….. 64

ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ ИММУНОДИФФУЗИИ ПО ПАРАМЕТРУ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АНАЛИЗА
Безгин В.М., Быкова Н.Н., Юдин В.И., Никитаева Н.Н., Алтухова А.А., Козлов В.Е., Косарева Т.В. ……..……..….. 72

БОЛЕЗНИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И БОРЬБА С НИМИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ
Белименко В.В., Самойловская Н.А., Исаев Ю.Г. …….. 79

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АЛИМЕНТАРНОГО КЕТОЗА У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ
Белоусов А.И., Красноперов А.С., Опарина О.Ю., Суздальцева М. А. ...88

TRICHINELLA SPIRALIS КАК ИНГИБИТОР ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
Бережко В.К., Новик Т.С., Ковешникова Е.И., Данилова Т.И., Написанова Л.А., Тхакахова А.А., Чукина С.И., Камышников О.Ю., Руднева О.В. …… 101

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНОГО ИММУННОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КРУЦИНА И КЛЕТОЧНОГО АНТИГЕНА ПРОТОСКОЛЕКСОВ ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЬВЕОЛЯРНОМ ЭХИНОКОККОЗЕ
Бережко В.К., Каллиникова В.Д., Руднева О.В., Написанова Л.А., Сасикова М.Р. ……... 111

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ПОЧВЫ
Бутко М.П., Попов П.А., Онищенко Д.А.,Осипова И.С. ……..….. 120

ТЕХНОЛОГИЯ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ ВЕТСАНОБЪЕКТОВ НОВЫМ ПРЕПАРАТОМ «АНОЛИТ АНК СУПЕР» В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ
Ваннер Н.Э., Прокопенко А.А., Филипенкова Г.В., Бахир В.М. ……...126

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
Величко Г.Н. ……..…….. 137

КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ БИОЛОГИИ
Гальнбек Т.В., Сайфутдинова З.Н., Кулешов К.В.,Калинин А.Г., Васильева А.Н., Потапова И.В. ……..….. 144

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ БОЛЮСОВ ДЛЯ КОРОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПОТОМСТВО
Головань В.Т., Юрин Д.А., Кучерявенко А. В. ……..….. 152

ДИНАМИКА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ФАСЦИОЛЕЗУ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ЗА ПЕРИОД ПОСЛЕДНИХ 6 ЛЕТ
Горохов В. В., Пузанова Е.В., Клёнова И. Ф. ……..….. 158

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН В 2016-2017 ГОДАХ
Л.Г. Гуламадшоева, Г.Н. Мамадатохонова, А.Н. Махмадшоев …… 166

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КРОВОСОСУЩИХ ДВУКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА (ОБЗОР)
Домацкий В.Н., Фёдорова О. А., Сибен А.Н. ……..….. 176

МОНИТОРИНГ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БОЛЕЗНЯМ РЫБ: ФАКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Булина К.Ю., Карпова М.А. ……. 182

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОРБЦИОННО-ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ В ОТНОШЕНИИ РАДИОНУКЛИДОВ ^{137}Cs И ^{90}Sr ПРИ ИХ СОЧЕТАННОМ АЛИМЕНТАРНОМ ПОСТУПЛЕНИИ С ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ
Захарова Л.Л., Жоров Г.А., Обрывин В.Н. ……..…….. 190

ФОРМИРОВАНИЕ ПРОДУКТИВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КУР-НЕСУШЕК ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОРМОВОЙ СМЕСИ НА ОСНОВЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ АНТИОКСИДАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНИЧЕСКОГО ЙОДА
Ильязов Р.Г., Паштецкий А.В., Остапчук П.С., Куевда Т. А. …….. 197

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ
Иматдинов А.Р., Дубровская О.А., Казакова А.С., Сливко И.А., Середа А.Д. ……..…….. 205

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ ЖИВОТНЫХ
Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С., Забережный А.Д., Комина А.К., Кучерук О.Д., Храмов А.П., Альбертян М.П. ……..….. 212

ВЫЯВЛЕНИЕ UREAPLASMA DIVERSUM В ОБРАЗЦАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Бирюкова А.Ю., Хаерова Р.Ф., Яцентюк С.П. ……..…….. 223

БАЗА ДАННЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
Козырева Н.Г., Иванова Л.А. ……..…….. 229

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНОК УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ И ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ
Кононенко А.Б., Банникова Д.А., Павлова И.Б., Бритова С.В. ……. 238

АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВИРУСАМИ СЕМЕЙСТВА FILOVIRIDE
Мазур Т.В. ……..…….. 246

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, СОДЕРЖАЩЕГО ПРИОННЫЙ БЕЛОК – ИНФЕКЦИОННЫЙ АГЕНТ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КОРОВ
Надточей Г. А., Антипин А.А. …….. 252

УЧЕТ И ОЦЕНКАРЕЗУЛЬТАТОВ СИМУЛЬТАННОЙ ПРОБЫ С ППД ТУБЕРКУЛИНОМ ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И КАМ
А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, О.Д. Кучерук, В.М. Калмыков ……... 260

МЫТ ЛОШАДЕЙ, ОСЛОЖНЕННЫЙ ПЛЕСНЕВЫМИ И ТОКСИГЕННЫМИ ГРИБАМИ
Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Петрова С.Г., Эльбядова Е.И. ….. 268

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В КОРМАХ ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ В САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ИХ КАЧЕСТВА
Пирязева Е.А. ……..…….. 273

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОТИПОВ И ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ ДИАРЕЕГЕННЫХ *E.COLI*
Поболелова Ю.И., Яцентюк С.П. ……...….. 284

РОЛЬ ДЕЗИНФЕКЦИИ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ
Попов Н. И., Суворов А. В., Мичко С. А., Лобанов С. М. ……... 291

ПРОГРАММА ДЛЯ СИСТЕМНОГО УНИЧТОЖЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ МУХ В УСЛОВИЯХ ПТИЦЕФАБРИКИ ПРИ КЛЕТОЧНО-БАТАРЕЙНОМ СОДЕРЖАНИИ ПТИЦЫ
Сафиуллин Р.Т., Новиков П.В., Нуртдинова Т.А., Дементьева В.А. … 301

ЦИФРОВЫЕ РЕЖИМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ *IN VITRO*
Сидорова В.Ю. ……...……..… 308

ДИНАМИКА ИНДЕКСА СООТНОШЕНИЯ ПСЕВДОЭОЗИНОФИЛОВ И ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ЦЫПЛЯТ
Моисеева А.А., Присный А. А. ……...….. 317

Цирковирусная инфекция свиней. Обзорные данные.
В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова ……...….. 324

ПЕРЕКРЕСТНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРОСТЕЙШИМИ РОДА Giardiasp., ВЫДЕЛЕННЫМИ ОТ СОБАК И КОШЕК.
Курносова О.П., Успенский А.В. …….. 331

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ МРНК ЦИТОКИНОВ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
Чугреева А.В., Кольцов А.Ю., Кольцова Г.С. ……..…. 340

ОЦЕНКА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА ТОКСОПЛАЗМОЗА В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА
Шабейкин А.А., Филимонова А.Д., Паршикова А.В., Шашурина Т.Е., Гришина Е. Е. …….. 347

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА АЧС С ДЕЛЕЦИЯМИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ
Шкаликова М.В., Кольцова Г.С., Титов И.А., Малоголовкин А.С. …. 357

РАЗРАБОТКА ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЛАБОРАТОРИИ ВИРУСОЛОГИИ ВИЭВ
Шуляк А.Ф., Юров К.П. ……... 365

120 ЛЕТ ВСЕРОССИЙСКОМУ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОМУ ИНСТИТУТУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ Я.Р. КОВАЛЕНКО

М.И. Гулюкин, доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН

В 2018 году ВИЭВ отмечает 120 лет со дня его основания. Итак, позади 120 лет. За этот период времени несколько раз менялась социально-политическая структура Российского государства. При царском режиме создавался фундамент института, то есть организовывались ветеринарные учреждения-лаборатории.

Так, на основании высочайшего повеления Николая II от 28 января 1898 года при Ветеринарном управлении Министерства внутренних дел было учреждена ветеринарная лаборатория, «…имеющая своими задачами изготовление прививочного материала против эпизоотических болезней, разрешение научно-практических вопросов, возникающих в ветеринарной практике, производство специальных исследований по поручению Ветеринарного управления и практическое совершенствование в науке прикомандированных лаборатории ветеринарных врачей».

В структуре созданной лаборатории функционировал ряд отделений: эпизоотологическое, бактериологическое, патологоанатомическое, противопаразитарное, физиологическое, биохимическое, гельминтологическое.

Основываясь на архивных данных, история института начинается с реорганизации ветеринарных учреждений, расположенных в тот период времени в Санкт-Петербурге. Так, в фонде ветеринарного управления Министерства внутренних дел обнаружено «Дело об учреждении при Ветеринарном управлении ветеринарной лаборатории и расходов по ее содержанию в 1898 1899 и 1900 годах», в котором имеется подлинный машинописный экземпляр Устава лаборатории, утвержденный 19 марта 1898 года товарищем министра внутренних дел бароном А.А. Икскуль фон Гильденбандтом, которая в последующем явилась основой для создания института.

Деятельность лаборатории определялась следующими положениями её Устава:

«…а) выработка и рассылка по требованиям различных учреждений и ветеринарных врачей сибиреязвенных вакцин и других препаратов, необходимых для ветеринарной практики;

б) ознакомление прикомандированных к лаборатории ветеринарных врачей с новейшими методами диагностики заразных болезней домашних животных и новыми способами борьбы этими болезнями;

в) проверка качества приготовляемых в России и ввозимых из-за границы различных веществ бактериального и животного происхождения, предназначенных для потребности ветеринарной практики;

г) исследования присылаемых в Министерство внутренних дел патологических продуктов целью разъяснения диагностических и судебно-ветеринарных вопросов;

д) разработка всех вообще научных вопросов по ветеринарии по поручению Ветеринарного управления МВД…»

За время своего существования с 1898 по 1917 год лаборатория значительно увеличила свою деятельность как по приготовлению прививочного материала и различных препаратов, так и по разработке научных и научно-практических вопросов.

С 1 июля 1898 года лаборатория начала отпускать сибиреязвенные вакцины, а с 1908 года сыворотку против сибирской язвы.

Кроме перечисленных препаратов в лаборатории изготовлялись: противоржистая сыворотка, сыворотка против септицемии свиней, сыворотка против холеры кур, а также в лаборатории в значительных количествах приготовлялись перипневмонические культуры против повального воспаления легких крупного рогатого скота и высылалась главным образом в Сибирь; бивалентная сыворотка против рожи и септицемии свиней, сыворотка против мыта, пироплазмозная кровь, сыворотка против чумы свиней и против пастереллеза.

При организации института, кроме названной ветеринарной лаборатории был присоединён Институт для приготовления вакцин и сывороток в имении Калитино, лаборатория при бюро по изучению кровепаразитарных болезней животных и лаборатория при отделении названного бюро по изучению тропических болезней и химиотерапии.

Все названные выше учреждения, функционирующие в то время в Санкт-Петербурге, преследовали приблизительно одинаковые цели и не были связаны между собою ни общей идеей, ни общим планом, и являлись изолированными друг от друга учреждениями. Такое положение вредно отражалось на делах и поэтому давно уже ощущалась потребность в объединении всех существующих при Ветеринарном Управлении лабораторий в одно учреждение - Институт Экспериментальной Ветеринарии.

22 августа (2 сентября 1917 г.) начальник ветеринарного управления МВД при Временном Правительстве, микробиолог Н.А. Михин, высказался в своем докладе «Состояние эпизоотий в стране и ближайшие мероприятия к их прекращению», сделанном в Москве на Всероссийском съезде по живот-

новодству, о необходимости «учреждения государственного института экспериментальной ветеринарии».

С помощью сотрудников Архива нам удалось найти Журнал Заседаний Временного Правительства. Читателю предлагается уникальный документ знаменательного события - «Журнал заседания Временного правительства по заключению Совещания Товарищей Министров 20 сентября 1917 года» (4 октября по н.с.):

«Присутствовали: председательствующий С.А. Шателен и члены совещания: В.И. Вернадский, К.Г. Голубков, В.Я. Гуревич, Л.Б. Кафенгаузен, В. К. Константинов, С.А. Котляревский, С.А. Кукелъ, И.Д. Мордухай- Болтовский, А.М. Петряев, М.И. Скипетров, кн. Г.Н. Туманов, И.И. Фалеев, И.В. Чернышев.

Слушали: Представление Министерства Внутренних Дел об учреждении Института Экспериментальной Ветеринарии.

Постановили:

I. Существующие при ветеринарном Управлении:

1) Лабораторию с отделениями: эпизоотологическим, бактериологическим, патолого-анатомическим, кровепаразитарным, физиологическим, биохимическим и гельминтологическим, 2) Институт для приготовления вакцин и сывороток в имении Калитино, 3) Лабораторию при бюро по изучению кровепаразитарных болезней животных и 4) Лабораторию при отделении названного бюро по изучению тропических болезней и химиотерапии – объединить в Институт Экспериментальной Ветеринарии на началах, изложенных в прилагаемых при сём уставе и временном штатном расписании названного Института.

II. Образование предусмотренных настоящим постановлением новых отделений предоставить Министру Внутренних Дел, по представлению Совета Института и по сношению с Министерством Финансов и Государственным Контролем.

III. Суммы, потребные на содержаниеИнститута Экспериментальной Ветеринарии, определяемые ежегодно в сметном порядке по действительной надобности, относить на средства Государственного Казначейства, с обращением в доход казны, в соответствующем размере, пособия из процентного сбора с гуртового скота.

Таким образом, решение об организации института экспериментальной ветеринарии было принято 10 октября 1917 года постановлением Временного Правительства России на основании представления ветеринарного управления МВД «об учреждении института экспериментальной ветеринарии» и заключения совещания товарищей министров (20 сентября 1917 г.).

Между Февральской буржуазно-демократической и Октябрьской социалистической революциями, в период правления Временного правительства России, 10 октября 1917 года вышло Постановление Временного правительства по образованию Института экспериментальной ветеринарии на базе структур Ветеринарного управления МВД. Через две недели после

принятия этого решения, в результате Октябрьской революции, Временное правительство было низвергнуто, а ветеринарное управление МВД этого Правительства прекратило работу и не функционировало несколько месяцев.

31 января1918 года Советское Правительство окончательно утверждает постановление о создании Института Экспериментальной Ветеринарии.

Первым директором Института экспериментальной ветеринарии был назначен Сергей Николаевич Павлушков, который до преобразования лаборатории в институт работал директором ветеринарной лаборатории МВД с 1911 года.

На совещании представителей ветеринарных организаций (коллегий губернских и областных ветеринарных отделов европейской части России и Западной Сибири), проведенном в Москве центральным ветеринарным отделом 14-19 июня 1918 года, по докладу С.Н. Павлушкова был принят устав института экспериментальной ветеринарии, причём основные задачи института были определены следующие:

а) разработка научных вопросов по ветеринарии и животноводству;

б) обновление познаний и научное усовершенствование ветеринарного персонала путем лекций и практических занятий на организуемых при институте курсах и допущения к работам в отделениях института по различным вопросам ветеринарии и животноводства;

в) усовершенствование и выработка методов изготовления диагностических, предохранительных, лечебных средств и других препаратов;

г) выработка и отпуск - бесплатный или за установленную советом института плату - означенных в предшествующем пункте средств для научно-ветеринарной практики;

д) испытание упомянутых средств и препаратов, вырабатываемых как русскими, так и иностранными лабораториями;

с) производство экспертиз;

ж) обсуждение и разработка всех вообще научно-практических вопросов по ветеринарной части, вносимых на заключение института.

В составе института определены отделения, разрабатывающие вопросы:

1) эпизоотологии; 2) бактериологии; 3) зоопаразитологии; 4) патанатомии; 5) физиологии; 6) фармакологии; 7) биологической химии; 8) клинической ветеринарии; 9) животноводства. Кроме того, в соответствии с требованиями жизни могут быть образованы отделения для вновь возникающих вопросов.

Были определены функции учёного совета института и другие вопросы деятельности института.

24 апреля 1918 г. на одном из организационных заседаний военной и гражданской ветеринарных коллегий был положительно решен вопрос об институте экспериментальной ветеринарии как об автономном учреждении, но при ветеринарном управлении.

9 мая 1918 года состоялось постановление Народного комиссариата внутренних дел об организации центрального ветеринарного отдела Комиссариата внутренних дел. Шестой пункт этого постановления гласит:

«При центральном отделе состоит институт экспериментальной ветеринарии как автономное учреждение на основании особо установленных штатов. Обязанности его и порядок управления определяются особым уставом».

Однако работа института не могла развернуться тотчас после его организации. По обстоятельствам военного времени Институт экспериментальной ветеринарии в 1918 году был эвакуирован из Петрограда в Москву и размещен в подмосковной усадьбе Кузьминки со всеми находящимися в нём строениями и инвентарём. Последний транспорт с имуществом института был доставлен в Кузьминки 1 ноября 1918 года.

4 марта 1919 г. Советом народных комиссаров было утверждено решение Малого Совета народных комиссаров от 27. февраля 1919 г., подписанное В.И. Лениным, о закреплении подмосковного имения Кузьминки со всеми находящимися в нем строениями и инвентарем за институтом экспериментальной ветеринарии и об отпуске Наркомвнуделу аванса в размере 1 000 000 рублей в счёт строительной сметы этого института. Тогда же специально созданная комиссия с участием представителя центрального ветеринарного отдела определила границы территории этого имения для института.

Для поднятия авторитета института 14 марта 1921 года ему присвоили наименование государственного. В этот день коллегия Наркомзема РСФСР утвердила «Временное положение о Государственном институте экспериментальной ветеринарии при Центральном ветеринарном управлении Народного комиссариата земледелия».

1 ноября 1921 года Центральным ветеринарным отделом управление институтом было поручено Временному правлению в составе директора профессора Руженцова Д.С. (военного ветврача) и членов правления профессора Балла Н.Д. и ветврача Руфимского И.П. Профессор Руженцов Д.С. осенью 1922 года передает дела вновь избранному директору ГИЭВ профессору Баллу Н.Д.

Государственный подход в проведении оздоровительных мероприятий по особо опасным болезням сельскохозяйственных животных в большинстве случаев решался положительно. Так, в 1917-1922 гг. угрозой для состояния животноводства страны являлась чума крупного рогатого скота. Она распространялась по многим губерниям. Правительство страны (тогда Советское правительство) дало указание местным органам власти, гражданской и военной службе о принятии решительных мер против распространения чумы. В 1919 году 11 сентября Председатель Совнаркома В.И. Ленин подписал декрет «О мерах прекращения и предупреждения чумы крупного рогатого скота в пределах РСФСР», а также правила, направленные на искоренение чумы крупного рогатого скота. Необходимо отметить, что в результате принятых мер тогда Советский Союз, а ныне Российская Федерация в настоящее время не знает этого коварного заболевания крупного рогатого

скота. Аналогичным способом осуществлялись мероприятия по борьбе с сапом лошадей. В 1920 году было принято Постановление Совета Народных Комиссаров по борьбе с сапом лошадей

В 1922 году в институте было 82 сотрудника, из них 45 научных, а в 1923 году уже состояло 137 человек, в том. числе 104 научных сотрудника.

К работе в институте были привлечены известные ученые: А.Н. Бах, К.И. Скрябин, С.Н. Вышелесский, С.Н. Павлушков, М.Ф. Иванов, И.И. Иванов, Е.Ф. Лискун, Н.Ф. Гамалея, СИ. Драчинский, М.И. Романович, А.П. Уранов и другие.

К концу 1922 года в институте было 13 отделений. Отделением гельминтологии заведовал профессор К.И. Скрябин; биохимии - профессор А.Н. Бах; отделом по изучению туберкулеза и сапа - профессор С.Н. Вышелесский; зоотехническим - профессор С.К. Лысогорский; позже профессор Е.Ф. Лискун и профессор М.Ф. Иванов; фармакологии - профессор Н.А. Сошественский; по изучению сибирской язвы - профессор Г.М. Андриевский; мясоведения - профессор М.И. Романович и другие. Позднее были открыты другие лаборатории, и в частности, отдел биологии размножения под руководством профессора И.И. Иванова, лаборатория протозоологии под руководством профессора С.И. Драчинского, по изучению болезней птиц под руководством профессора П.В. Сизова и другие.

Часть лабораторий размещалась в Кузьминках, а часть в Москве и в других местах. В 1921 году для массового изготовления сыворотки против чумы свиней был организован филиал ГИЭВ на хуторе Романовском при станции Кавказская. В 1924 году лаборатории болезней свиней была выделена Кашинцевская противочумная станция (позднее биофабрика).

В 1921 году в совхозе «Поповском» Бобровского уезда, Воронежской губернии, было организовано противочумное отделение ГИЭВ, которым заведовал профессор С.И. Драчинский, для борьбы с чумой крупного рогатого скота.

На основании решения Совета Народных Комиссаров РСФСР от 24 июня 1926 года на ГИЭВ были возложены обязанности по научной консультации и научному руководству исследованиями, проводимыми во всех научно- исследовательских ветеринарных учреждениях страны, количество которых к 1927 году достигает 34.

В 1929 году из состава института выделилось зоотехническое отделение, которое с другими учреждениями послужило основой для организации Всесоюзного института животноводства (ВИЖ).

В 1930 году ГИЭВ был преобразован во Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), передан в «систему ВАСХНИЛ и согласно постановлению СНК СССР от 01.02.1930 г. институту было придано всесоюзное значение для руководства всей системой ветеринарных научно-исследовательских учреждений в СССР.

В этом же году в институте была открыта аспирантура. Подготовка научных кадров проводилась, и проводиться через докторантуру, аспиранту-

ру и соискательство. За все время подготовлено 185 докторов наук и 1203 кандидата наук.

В 1931 году институт некоторое время именовался Всесоюзный НИИ экспериментальной ветеринарии и зоогигиены (ВИЭВиЗ) ВАСХНИЛ.

По инициативе и при активном участии К.И. Скрябина в составе ВИЭВ в 1931 году был организован Гельминтологический институт, который в 1933 году был преобразован во Всесоюзный институт гельминтологии (ВИГИС).

В 1931 году государственный контроль в биологической промышленности был возложен на вновь организованный Государственный научно-контрольный институт (ныне ВГНКИ). Который в настоящее время сформировался как Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (подведомственный Россельхознадзору)

В 1932 году отделение мясоведения было преобразовано в ветеринарно-санитарный отдел, который был выведен из состава ВИЭВ в 1941 году.

В 1936 году ВИЭВ имел в своем составе 30 отделов и лабораторий со штатом 432 человека, в т.ч. 113 научных сотрудников, кроме того, при институте состояла группа эпизоотических ветврачей.

С 1938 года в возрасте 32 лет институт возглавил Н.И. Леонов (1938-1955). На этом ответственном посту он проработал 17 лет.

В годы Великой Отечественной войны Н. И. Леонов одновременно исполнял обязанности начальника Главного ветеринарного управления Наркомзема СССР и был консультантом наркома земледелия.

Для постановки острых опытов с заразными болезнями сельскохозяйственных животных (ящур и др.) в 1938 году была создана опытная база на острове Лисий (Вышневолоцкое водохранилище, Тверская область).

Следует вспомнить, что в конце 40-х и начале 50-х годов прошлого столетия, доминировали доводы Г.М. Бошьяна, В. Крестовниковой и других о существовании фильтрующих форм микробов, и о возможности превращения вируса в микроб. Более 50% финансовых средств института в те годы были направлены на обеспечение лабораторий Г.М. Бошьяна и А.С. Дорогова. Все это негативным образом отражалось на обеспечении реактивами, оборудованием, приборами других лабораторий. Вместе с тем, необходимо отметить, что в этот период времени, на долю сотрудников института выпала очень ответственная и сложная обстановка, связанная с предвоенным, военным и послевоенным периодом работы коллектива.

В ветеринарную практику были внедрены разработки А.С. Дорогова – АСД фракция I и II.

К сороковым годам, благодаря успешному решению ряда научных и практических вопросов, в стране шло неуклонное снижение заболеваемости и смертности от инфекционных, протозойных и других болезней сельскохозяйственных животных.

В связи с приближением линии фронта к Москве, в октябре 1941 года ВИЭВ был эвакуирован в г. Омск, где развернул научно-исследовательскую

работу на базе Омского НИВИ. Реэвакуация ВИЭВ из Омска была начата в 1942 году и закончена в 1943 году. Несмотря на трудности военного времени, эвакуацию и реэвакуацию, институт не прекращал своей работы.

И только по прошествии большого количества времени, и испытав на себе переезд института из усадьбы Кузьминки в новое здание на Рязанском проспекте, можно представить о тех трудностях, которые выпали на долю администрации института и сотрудников.

В период Великой Отечественной войны ветеринарные специалисты тыла и фронта, вооруженные научно обоснованными рекомендациями, успешно справлялись с задачей охраны животноводства от массовых потерь и эпизоотий. В условиях войны ученые ВИЭВ активно участвовали в разработке мероприятий по профилактике возникновения эпизоотий и сохранению поголовья на местах поенных действий и во время эвакуации и реэвакуации. В стране не было допущено возникновения значительных вспышек инфекционных болезней животных.

С 1955 года по 1977 год деятельностью ВИЭВ руководил профессор Я.Р. Коваленко (впоследствии академик ВАСХНИЛ). Ему, как новому директору ВИЭВ, пришлось решать сложные и ответственные задачи, так как в то время многие проблемы ветеринарной науки были сконцентрированы в этом институте, а деятельность института была расстроена в связи с эпопеей Г.М. Бошьяна.

За период работы директором ВИЭВ академика ВАСХНИЛ Я.Р. Коваленко (1955-1977), было восстановлено доверие и уважение ученых и практических специалистов к различным разработкам ВИЭВ - головного научного ветеринарного центра в стране.

В институте создаются новые научные направления, и для их решения формируются структурные научные подразделения: лаборатория антибиотиков и микологии (1957 г.); вирусологии (1959 г.); лаборатория по изучению лейкозов и злокачественных опухолей животных (1961 г.); лаборатория по изучению болезней рыб (1961 г.); по изучению болезней пчёл (1961 г.); биофизики (1966 г.); иммунологии (1967 г.); общей эпизоотологии (1970 г.); культуры тканей и питательных сред (1970 г.); научно-организационный отдел (1970 г.); лаборатория но изучению болезней овец (1978 г.); а также отделы: Белгородский (1973 г.); Вышневолоцкий отдел с опытной базой на о. Лисий (1977 г.); Калужский отдел по изучению лейкозов (1977 г.); Подольский отдел но профилактике болезней рыб и охране: рыбохозяйственных водоемов (1977 г.).

Обладая огромным даром научного провидения, Яков Романович с группой научных сотрудников ВИЭВ (Б.Г. Иванов, А.Г. Бахтин, Е.П. Исаенко, В.К. Кретинин, М.А. Сидоров, Л.Г. Бурба) впервые в нашей стране, в 1961 - 1965 И провели важные исследования по изучению африканской чумы свиней в экспериментальных условиях, заложив тем самым основы изучения экзотических инфекционных болезней животных. Полученные данные позволили обобщить материалы по биологии вируса, его антигенным свойст-

вам, устойчивости к различным физическим и химическим факторам, сохранению в окружающей среде, клиническому проявлению болезни и патолого-анатомическим изменениям. В 1965 году была утверждена Временная инструкция по профилактике и борьбе с африканской чумой свиней, издана монография «Африканская чума свиней». Методы диагностики и борьбы с африканской чумой свиней, разработанные учеными ВИЭВ, прошли успешное испытание в 1971 и 1980 годах на Кубе, а позже и в нашей стране - в Одесской, Киевской и Свердловской областях.

В лаборатории зоогигиены была разработана и внедрена в практику дезинфекционная установка (ДУК) профессора Комарова, которая оказала большую помощь специалистам в проведении дезинфекций при инфекционных болезнях сельскохозяйственных животных.

В 1977 году директором института был избран профессор Г.Ф. Коромыслов. В 1988 году он был избран действительным членом (академиком) ВАСХНИЛ и Генеральным директором Отраслевого научного комплекса по ветеринарии ВАСХНИЛ и членом Президиума ВАСХНИЛ. Исполнял обязанности академика-секретаря Отделения ветеринарии ВАСХНИЛ.

Георгий Фёдорович Коромыслов активно участвовал в общественно-научной работе, избирался народным депутатом СССР, руководил Центром по зоонозам ВОЗ (при ВИЭВ), достойно представлял отечественную ветеринарную науку на ежегодных Генеральных сессиях Международного эпизоотического бюро (МЭБ) и Всемирных ветеринарных конгрессах.

Много сил и энергии потратил Георгий Фёдорович при согласовании и получении разрешения от государственных структур (Моссовет, Министерство сельского хозяйства, Минфин, Райсовет и др.) на строительство административно-лабораторного корпуса ВИЭВ, и ввод его в эксплуатацию.

В связи с решением Моссовета о передислокации Института из усадьбы Кузьминки на Рязанский проспект, потребовались значительные усилия, как академиков Я.Р. Коваленко, Г.Ф. Коромыслова, М.И. Гулюкина, так и заместителей директора по строительству П.И. Ковальчука, Л.С Хархардина, Г.Г. Ушаковой, которые на протяжении длительного периода строительства уделяли много творческой энергии, упорства, настойчивости в решении этого вопроса. Итог этого труда теперь можно оценить по достоинству, когда в 2003 году институт переехал в новое здание на Рязанском проспекте.

Конечно же, вся эта работа, связанная с деятельностью института, плодотворной работой ученых, их открытиями, разъездами и переездами не была бы так успешна, если бы не слаженная работа учётно-финансового отдела под умелым и грамотным руководством начальника отдела В.И. Дрошневой и её заместителя М.М. Дьяковой.

Учитывая большие заслуги директора ВИЭВ, академика ВАСХНИЛ Якова Романовича Коваленко, в развитии ветеринарной науки и подготовке кадров, Совет Министров СССР постановлением от 26 мая 1981 года за №

436 присвоил имя Я.Р. Коваленко Всесоюзному научно-исследовательскому институту экспериментальной ветеринарии.

В 1992 году ВИЭВ был преобразован во Всероссийский научно- исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук.

Институт является ведущим учреждением по инфекционной патологии животных в России, проводит совместные исследования с институтами РАН, РАМН и рядом других институтов биологического и медицинского профиля Российской Федерации, стран СНГ, Балтии и других зарубежных стран.

В июле 1998 года состоялась научная сессия Российской академии сельскохозяйственных наук, которая была приурочена к 100-летнему юбилею Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко.

В институте созданы и функционируют **два референтных центра Международного эпизоотического бюро (МЭБ)**:

- референтная лаборатория Международного эпизоотического бюро (МЭБ) но случной болезни лошадей функционирует в ВИЭВ с 1996 года на базе лаборатории протозоологии. В лаборатории проводится работа но поддержанию штаммов Трипаносома эквипердум, совершенствованию Диагностики случной болезни лошадей, контролю совместно с ВГНКИ ветеринарных препаратов за качеством серий трипаносомного антигена, используемого в стране для диагностики случной болезни; разработке серологических методов дифференциальной диагностики случной болезни и суауру лошадей; сравнительному испытанию диагностической ценности всех коммерческих антигенов, призводимых в мире для диагностики случной болезни лошадей.

- рефрентная лаборатория Международного эпизоотического бюро; (МЭБ) но герпеспирусным болезням лощадей функционирует в ВИЭВ с 1996 года на базе лаборатории вирусологии. В лаборатории проводится работа по поддержанию референтных штаммов герпесвирусов лошадей; идентификации и типированию вновь выделенных штаммов вирусов; оказывается помощь различным регионам России и стран СНГ в диагностике вирусных болезней лошадей.

Необходимо отметить, и особенно подчеркнуть, что впервые в Советском Союзе в **лаборатории вирусологии** ВИЭВ в 1969 году выделены и идентифицированы возбудители инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота (Н.Н. Крюков, З.Ф. Зудилина, Г.А. Надточей), а в 1977 году во время вспышки острого заболевания крупного рогатого скота в Тульской области впервые был изолирован возбудитель вирусной диареи-болезни слизистых (Н.Н. Крюков, К.П. Юров, З.Ф. Зудилина, С.А. Жидков) и показана перспективность применения гетерологичной вакцинации при этой болезни.

Для специфической профилактики вирусных желудочно-кишечных болезней новорожденных телят сотрудниками лаборатории были разработаны ряд вакцин: «Вакцина инактивированная ассоциированная против ротавирусного, коронавирусного энтеритов телят и вирусной диареи крупного рогатого скота «РОДИКОР-ВАК ВИЭВ»; инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против вирусной диареи крупного рогатого скота; инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против ротавирусного энтерита телят; инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против коронавирусного энтерита телят.

На все диагностические наборы и вакцины разработана и утверждена нормативно-техническая документация (НТД), получены патенты, проведена сертификация и регистрация в Федеральной службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору.

При выяснении природы массового респираторного заболевания лошадей в 1969 году впервые в Советском Союзе выделен вирус гриппа лошадей 2-го типа (К.П. Юров, Н.Н. Крюков), а несколько ранее – возбудитель вирусного аборта лошадей (К.П. Юров в другие).

В настоящее время биологическая промышленность выпускает и реализует поливалентную и инактивированную вакцину против гриппа лошадей, вирусвакцину против ринопневмонии лошадей, наборы диагностикумов ИНАН, сапа.

Утверждены инструкции, разработанные сотрудниками института, по борьбе с инфекционной анемией лошадей, ринопневмонией лошадей, гриппом лошадей.

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН) на территории Советского Союза впервые была описана проф. А. В. Васильевым в 1929 г. под названием перниционзная анемия и экспериментально установлена в 1932 г. (проф. И. В. Поддубский, проф. Б. Г. Иванов), причем было доказано, что она ничем не отличается от инфекционной анемии, описанной более 100 лет назад многими авторами.

В настоящее время наблюдаются единичные случаи данного заболевания, которое довольно быстро удается купировать и ликвидировать.

В институте **созданы, развиваются и функционируют** «Специализированная коллекция клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных», и Всероссийская специализированная коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных, входящие в состав Российской коллекции культур клеток РАН. В **коллекции и криобанке ВИЭВ** (Гальнбек Т.В., к.б.н.) хранится 125 штаммов и линий клеток от 25 видов животных (6 - насекомые), в т.ч. гибридомы, гибридные культуры клеток сельскохозяйственных и других видов животных и генетически трансформированные культуры клеток. Осуществляется обмен культурами клеток с зарубежными коллекциями (США, Великобритания, Германия, Япония и др.).

Поддерживается генетический фонд микроорганизмов. Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июня 1996 года № 725-47 с

в ВИЭВ учреждена «Коллекция патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов возбудителей инфекционных болезней животных», которая насчитывает 447 штаммов биологических объектов (286 штаммов бактерий, 41 штамм вирусов, 65 штаммов грибов, 8 штаммов простейших), в т.ч. 70 производственных, 298 эталонных, 79 эпизоотических.

Функционирует **лаборатория стволовой клетки** под руководством доктора биологических наук, профессора Савченковой И.П. В лаборатории проводится большая работа по поддержанию и развитию Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (СХЖ РАСХН). Из костного мозга, подкожного жира, овец, крупного рогатого скота, кошек, собак, пуповинной крови лошадей выделены клетки с характеристиками мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. Разработаны методические наставления по их выделению и поддержанию в культуре. Получены 4 патента на культуры мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. Разработан метод транспортировки культур клеток, позволяющий сохранить жизнеспособным биологический материал длительное время.

Начаты работы по изучению инфекций сельскохозяйственных животных и развитию вирусной инфекции в стволовых клетках различного происхождения, а также в процессе их дифференцировки в разные типы клеток. Лаборатория приступила к исследованиям по созданию новых клеточных систем с заданными свойствами на основе клеток млекопитающих, подвергнутых генетической трансформации invitro. Получена перевиваемая линия STO эмбриональных фибробластов мыши, с генами лошади: рецептора вируса ИНАН (ELR1) и циклина Т1 (eT1). В перспективе эти данные составят прочную научную основу для производства антигенов, диагностических препаратов и вакцин.

Научные направления лаборатории были поддержаны грантом РФФИ.

За период работы в Институте профессором Савченковой И.П. создана научная школа специалистов по клеточной биотехнологии: подготовлен 1 доктор биологических наук и 4 кандидата биологических наук, трое из которых работают в настоящий момент в лаборатории.

В институте (**лаборатория ихтиопатологии**, заведующая лабораторией Завьялова Е.А., к.б.н.) большое внимание уделяется состоянию и перспективам научных исследований по инфекционным болезням рыб.

В лаборатории проводится мониторинг по вирусным и бактериальным болезням рыб в рыбоводческихххозяйствахМосковской, Ленинградской, Мурманской, Калужской, Новгородской, Орловской, Рязанской, Смоленской, Тверской областей, Краснодарского края, Республик Карелия, Башкирия, Северная Осетия и Удмуртия. В ходе проведения этой работы сотрудники лаборатории впервые в стране выделили вирус инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) от молоди семги, завезенной из Норвегии. Впоследствии этот вирус многократно выделяли от форели в некоторых регионах страны. Впервые выделили вирус геморрагической

септицемии лососевых (VHSV) от культивируемых и диких популяций рыб, вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани (1HNV) в одном из рыбопитомников страны.

Одной из основных задач и наиболее перспективным направлением работы лаборатории остаётся совершенствование системы ветеринарно-санитарных мероприятий, разработка и внедрение в ихтиопатологическую практику вакцин и препаратов, один из которых, «Витарол-Е», обладающий антибактериальным и антиоксидантным действием, предназначен для профилактики и лечения бактериальных болезней рыб, таких как аэромоноз, псевдомоноз, миксобактериоз, вибриоз, БГС.

Зарубежный опыт показывает, что приоритетное направление в борьбе с болезнями рыб получили методы специфической профилактики, основанные ««использовании вакцин, что позволит отказаться от применения антибиотиков и других медикаментозных средств, вызывающих нежелательные побочные явления.

Поэтому в лаборатории ихтиопатологии была разработана инактивированная, поливалентная формолвакцина на гидроокиси алюминия против вибриоза лососевых рыб. В составе 3 штамма Vibrioanguillarum, 2-х серотипов. Отработан лабораторный регламент изготовления и успешно проведены производственные испытания иммерсионной и инъекционной форм.

Сейчас поводятся лабораторные испытания моно- и поливалентных вакцин против йерсиниоза лососевых. Ведутся работы по изысканию и получению вакцин против флексибактериоза, псевдомоноза и фурункулеза.

В современных условиях возникла необходимость внедрения новых методов для тонкой идентификации и типирования вирусных изолятов - ПЦР. Сотрудниками созданы тест-системы ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией для идентификации возбудителей особо опасных и наиболее распространенных вирусных болезней рыб - IPNV (инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых), IHNV (инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых), VHSV (вирусная геморрагическая септицемия лососевых). SVCV (весенняя виремия карпов). Разрабатываются тест-системы ПЦР в режиме «реального времени». Применение ПЦР в диагностике вирусных болезней рыб очень перспективно, дополняя классические вирусологические методы, открывает новые возможности для быстрой идентификации возбудителя, а также позволяет выявлять скрытое вирусоносительство в популяции внешне здоровых рыб, что особенно важно при трансграничных перевозках гидробионтов.

Активная работа проводится по медленным инфекциям. Особое место занимает губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота – «болезнь бешеной коровы» и скрепи овец. В Российской Федерации скрепи овец зарегистрированы среди животных романовской породы.

В экспериментах ведутся наблюдения за зараженными прионами животными и отрабатываются диагностические подходы по выявлению больных особей (Г.А. Надточей)

В институте плодотворно работает **лаборатория болезней пчёл** (заведующий лабораторией – А.Н. Сотников).За истекшие годы для борьбы с болезнями пчёл предложено 33 лечебных препарата, 8 диагностикумов, разработан 151 нормативный документ, включая 7 обновляемых изданий инструкций по борьбе с болезнями пчёл, рекомендации по изучению патогенов этих насекомых, учебные программы и др. Результаты работы защищены 27 авторскимисвидетельствами (патентами).

В число основных задач научно-исследовательской работы **лаборатории эпизоотологии** ВИЭВ входят изучение закономерностей эпизоотического процесса и географии особо опасных зооантропонозов, совершенствование методологии эпизоотологического анализа.

В лаборатории разработаны и постоянно пополняются электронные кадастры пунктов неблагополучных по сибирской язве и бешенству.

Электронный Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации охватывает временной период с 1900 года по настоящее время и содержит записи о 70400 вспышках болезни, зарегистрированных в 35800 населенных пунктах.

Анализ динамики регистрации вспышек сибирской язвы позволяет дать заключение о переходе заболеваемости животных в категорию спорадической. Однако риск нового подъема заболеваемости животныхостается достаточно высоким. Сотрудники лаборатории, к.в.н. А.А. Шабейкин, к.б.н. А.М. Гулюкин проводят ежемесячно мониторинг бешенства в РФ; картографирование выявленных случаев болезни позволяет постоянно уточнять ее ареал, определять основные центры эпизоотии, своевременно выделять угрожаемые территории. Фактически осуществляется оперативное прогнозирование обстановки. Обработанные данные направляются в ВОЗ и публикуются ежеквартально в бюллетене «Бешенство в Европе».

26 апреля 1922 г. в Москве в ГИЭВ (в дальнейшем ВИЭВ) был открыт **отдел по изучению туберкулеза**, который впоследствии стал основоположником борьбы с туберкулёзом животных в России.

Первым заведующим этого отдела стал академик С.Н. Вышелесский (1922-1928). Затем отдел возглавил профессор П.П. Вишневский (1928-1935, 1938-1949). В последующем в разные годы отделом по изучению туберкулёза руководили профессор М.К. Юсковец (1937-1941, 1949-1956), профессор И.В.Поддубский (1956-1971), профессор В.Е.Щуревский (1971-1981), профессор Н.П.Овдиенко (1981-2001). С 2001 года и по настоящее время теперь уже лабораторией микобактериозов руководит профессор Найманов А.Х.

За почти вековую деятельность лаборатории микобактериозов было создано научное направление - научная школа, объединившее в исследовательский коллектив не только научных сотрудников ВИЭВ, но и учёных других организаций. Это сообщество единомышленников - исследователей, соратников и учеников, объединённых решением задачи по совершенствованию средств и методов диагностики, оздоровительных и профилактических мероприятий при туберкулёзе и паратуберкулёзе животных.

За последние годы коллективом лаборатории опубликовано более 500 научных и методических работ. Результаты научных исследований включены в 8 нормативных документов, утвержденных директивными органами, в т. ч. в Санитарные и Ветеринарные правила «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. П.10 Туберкулёз» (1996 г.), в «Наставление по диагностике туберкулёза животных» (1986, 2002 гг.), в «Наставление по диагностике паратуберкулёза животных» (2001 г.).

Внедрение в широкую ветеринарную практику основных положений утвержденных нормативных документов позволило значительно уменьшить проблему туберкулёза крупного рогатого скота. Так, в 1987 в РСФСР было 1945 неблагополучных пунктов, а на 01.01.2018 г. остаётся 12 неблагополучных по туберкулёзу пунктов.

В последние годы по мере сокращения количества неблагополучных пунктов и заболевших туберкулёзом животных, т.е. улучшения эпизоотической ситуации, увеличивается выявление реагирующих животных с неспецифическими реакциями на туберкулин в благополучных хозяйствах. В последние годы в нашей стране сложилась такая ситуация, когда количество реагирующих животных в благополучных хозяйствах в 9 раз превышает количество таковых в неблагополучныххозяйствах. В соответствии с этим, в Институте к настоящему времени разработаны два новых аллергена (ППТ-туберкулин) для дифференциации, получен патент, подготовлены наставления по их применению. На Выставке «Золотая осень – 2018» данные разработки были удостоены Золотой медали.

Лаборатория протозоологии была организована в 1923 году.Сотрудниками лаборатории внесён значительный вклад в развитие ветеринарной науки Советского Союза и России. Подтверждением этого является то, что в настоящее время на её базе функционирует референтная лаборатория МЭБ по случной болезни лошадей, осуществляющая мониторинг эпизоотической ситуации в стране по случной болезни, разработку и внедрение мероприятий по борьбе и профилактике болезни, поддержание референтных и выделение новых штаммов T. equiperdumi T. evansi, совершенствование диагностики случной болезни, исследования на заболевание в спорных случаях и при экспорте лошадей за рубеж.

Сотрудниками лаборатории изучены биологические циклы развития возбудителей кровепаразитарных болезней животных и их взаимоотношения с клещами-переносчиками; культивирование тейлерий и трихомонад; ультраструктура и криогенизация простейших и анаплазм; антигенная вариабельность у трипаносом; совершенствование систематики простейших.

В лаборатории разработаны методы диагностики (РСК, РДСК, ИФА, полимеразная цепная реакция, РНИФ и РНГА) пироплазмидозов, анаплазмоза, трипаносомозов, неоспороза, криптоспоридиоза; вакцинопрофилактика и терапия анаплазмоза рогатого скота, радикальная борьба с клещами, химиопрофилактика при пироплазмидозах. Осуществляется мониторинг эпизооти-

ческой ситуации по случной болезни лошадей на территории Российской Федерации.

За разработку и внедрение живой культуральной вакцины против тейлериоза крупного рогатого скота в 1986 году группа сотрудников лаборатории (Заблоцкий ВТ, Степанова НИ и др.) удостоена звания лауреатов Государственной премии СССР.

Приоритетными направлениями исследований лаборатории являются: разработка и усовершенствование средств и методов диагностики, лечения и специфической профилактики протозойных болезней всех видов сельскохозяйственных и домашних животных и анаплазмоза рогатого скота.

В криобанке лаборатории сохраняются штаммы 9 видов возбудителей протозойных болезней животных и анаплазм.

В апреле 1957 года во Всероссийском институте экспериментальной ветеринарии по инициативе директора института Я.Р. Коваленко и профессора, доктора наук, А.Х. Саркисова организуется **лаборатория микологии и антибиотиков**.

Первым заведующим лабораторией был назначен Арутюн Христофорович Саркисов. Под руководством А.Х. Саркисова проводились работы по изучению закономерностей иммуногенеза при дерматофитозах животных. Результатом является создание высокоиммуногенных вакцин, обеспечивающие защиту всех видов сельскохозяйственных животных от дерматофитозов. Благодаря этому открытию и налаженному производству вакцин, резко снизилось заболеваемость животных по всему миру. Сотрудники лаборатории С.В. Петрович, Л.И. Никифоров, Л.М. Яблочник и В.П. Королева, которые принимали участие в изучении дерматофитозов и разработке вакцины ТФ-130 (ВИЭВ) против трихофитии крупного рогатого скота, были удостоены высокого звания Лауреатов Государственной премии СССР.

В лаборатории были созданы и внедрены в производство пролонгированные формы антибиотиков - биовит, биоветин, дибиомицин- ПЭГ, дибиовитин, левоэритроциклин, леватетросульфин и другие. Методика их рационального применения при инфекционных болезнях животных значительно снижает экономический ущерб животноводству.

В настоящее время в лаборатории микологии работает 5 сотрудников, основным родом деятельности является разработка современных средств экспресс-диагностики и идентификации видов грибов-дерматофитов. Так в 2017-18 г. была разработана и апробирована новая питательная среда для выделения дерматофитов р. Трихофитон и Микроспорум, позволяющая за 3-5 дней получать чистые культуры, полностью подавляющая рост бактериальной микрофлоры и грибов-контаминантов. На выставке «Золотая осень» в 2018 г. разработка «Дифференциально-диагностическая среда для выявления грибов-дерматофитов «ДТМ-ЭКСПЕРТ» получила Серебряную медаль ВДНХ.

Для эффективной борьбы с лейкозом крупного рогатого скота сотрудниками **лаборатории лейкозологии** разработаны и утверждены вМинюсте правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота.

Совместно с сотрудниками Курской биофабрики получены и охарактеризованы 3 штамма гибридных культур клеток, продуцирующих моноклональные антитела, в том числе штамм 1Н8 постоянной гибридомной линии клеток мыши - продуцент моноклональных антител к IgG овцы; штамм 5А10 постоянной гибридомной линии клеток мыши - продуцент моноклональных антител к IgG крупного рогатого скота; штамм 8С12 постоянной межвидовой гибридной линии клеток мыши и овцы - продуцент моноклональных антител к гликопротеидиому антигену вируса лейкоза крупного рогатого скота. Штаммы депонированы в Специализированной Коллекции перевиваемых соматических культур сельскохозяйственных и промысловых животных.

Разработаны наборы для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота методом РИД и твердофазного иммуноферментногоанализа (ИФА) в двух вариантах – скриннинг и верификация (Гулюкин М.И., Иванова Л.А.)

Зарегистрирован Россельхознадзором разработанный и изготовленный совместно с Курской биофабрикой диагностический «Набор для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотке крови и молоке иммуноферментным методом» на основе моноклональных антител.

В международной базе данных GenBank зарегистрированы 85 последовательностей ДНК участка провирусногогенома ВЛКРС под следующими номерами: JQ400140, JQ400142, JQ400143, JQ400144, JQ400146, JQ400147, JQ400148, JQ429586 (к.б.н. Козырева Н.Г.).

Составлен информационно-аналитический бюллетень «Обзор эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в субъектах Российской Федерации за 15 лет» (Барабанов И.И., Симонян Г.А., Степанова Т.В.).

Лаборатория микробиологии с музеем типовых культур института (заведующий – канд. вет. наук Горбатов А.В.), как и в предыдущие годы, опирается на многолетние мониторинговые данные эпизоотической ситуации по бактериальным заболеваниям молодняка, анализ эффективности существующих вакцин против этой группы заболеваний, а также предусматривает использование современных методик серологической индикации антител, методы очистки антигенов, их контроля. В связи с высокой инцидентностью рота,-коронавирусов и эшерихиоза крупного рогатого скота в качестве объекта для разработки было выбрано создание вирусно-бактериальной вакцины против рота,- коронавирусных инфекций и колибактериоза телят. В результате исследований, проведенных в 2013 -2018 гг. получены экспериментальные данные о высоком уровне защиты молозива вакцинированных коров для телят, в сыворотке которых регистрировали достоверное и значительное увеличение специфических антител против трех групп адгезиновК99. Att- 25 и F41 E.coli и рота-, коронавирусов крупного рогатого скота.

На основании полученных результатов разработаны «Исходные требования по изготовлению и применению...» данной вакцины, получено Уве-

домление о положительном результате формальной экспертизы заявки на изобретение по вакцине, Проект нормативно-технической документации на трехвалентную вирус-бактериальную вакцину против рота-, коронавирусной инфекций и колиэнтеритов телят, включающий инструкцию по изготовлению вакцины, инструкцию по её применению, СТО (стандарт организации ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Разработанный Стандарт (СТО) распространяется на «Трехвалентную вирус-бактериальную вакцину против рота-, коронавирусной инфекции и колиэнтеритов телят», предназначенную для иммунизации стельных коров с целью получения от них молозива и молока с высоким уровнем антител для выпаивания новорожденным телятам и создания у них пассивного иммунитета в неблагополучных по вирусным энтеритам хозяйствах. Соблюдение изложенных требований и норм обеспечит поступление на потребительский рынок качественной, безопасной и конкурентно-способной продукции. Полученные данные соответствуют мировому уровню разработок, поскольку оригинальный метод приготовления бактериального компонента разрабатываемой нами вакцины позволяет получить напряженный иммунитет у телят против рота-,коронавирусных инфекций в сочетании с колибактериозом. Разработка вакцины отмечена Серебряной медалью на выставке «Золотая осень - 2018».

Институт с самого начала своей работы непосредственно был **связан с руководящими ветеринарными учреждениями** Советского Союза, Российской Федерации являлся и является консультативным органом по всем вопросам противоэпизоотических мероприятий в стране. Он готовил и готовит биопрепараты (вакцины, сыворотки, диагностические средства), осуществлял до организации ГНКИ (1931 г.) контроль за биопрепаратами, производившимися в стране и ввозимыми из-за рубежа, а также выполнял экспериментально-диагностические исследования. Свою теоретическую и научно-практическую работу ВИЭВ всегда строил и осуществлял в соответствии с текущими требованиями животноводства и с учетом эпизоотического состояния страны.

Сотрудники института принимают активное участие в работе комиссий Департамента ветеринарии МСХ РФ, в работе специализированных учёных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций, в работе Бюро Отделения сельскохозяйственных наук РАН, секции «Инфекционной патологии животных». Ученые принимают активное, участие в обсуждении научных проблем, в осуществлении проверок, проводимых Департаментом ветеринарии Минсельхоза России.

В институте сегодня развернуты работы практически по всем направлениям современной биологической науки: от патоморфологии, патогистологии, бактериологии, вирусологии до стволовой клетки, с использованием современных методов генной инженерии.

В списке общих задач находятся также разработка и создание принципиально новых подходов в обеспечении благополучия животноводства

страны, как например, разработка и создание федеральных программ по профилактике и борьбе с вирусной диареей, ринотрахеитом, лейкозом, сибирской язвой, бешенством и т.д.

Аспирантура в институте была открыта в 1930 г. (в наст. время зав. аспирантурой канд. биол. наук Дроздова Е.И.) За время работы аспирантуру ВИЭВ закончили более тысячи человек, из них более 800 - очную и более 200 - заочную. Всего было подготовлено около 200 докторов и более 1200 кандидатов наук.

Подготовка научно-педагогических кадров по программам аспирантуры осуществляется в Институте на основании Лицензии по следующим направлениям 06.06.01 — Биологические науки и 36.06.01 — Ветеринария и зоотехния.

Научное руководство аспирантами осуществляют, как правило, доктора наук: заведующие лабораториями и ведущие специалисты института. Научные исследования проводятся в лаборатория филиала института.

Институт входит в Ассоциацию образовательных и научно-исследовательских учреждений по координации образовательной и научной деятельности в сельскохозяйственных отраслях «Ветеринария, зоотехния и биотехнология».

В настоящее время в ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН работает **совет по защите диссертаций** на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 006.033.02 по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные и биологические науки), (приказ Минобрнауки России о создании №1495/нк от 27.11.15 г.). В период с 2010 по 2018 год в совете состоялось 6 защит докторских и 28 кандидатских диссертаций.

Действует **Совет молодых ученых**(председатель совета – канд. биол. наук Белименко В.В.) и специалистов, по инициативе которого организован ежегодный цикл семинаров для молодых учёных и специалистов Школы молодых ученых ВИЭВ с участием исследователей и руководителей ветеринарных служб из США, Великобритании, Испании и Китая. В них принимают участие специалисты, молодые ученые и студенты ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. КИ. Скрябина, РУДН ВНИИВСГЭ, ВНИИП, ВНИИВИМ, Щелковского биокомбината, ВНИИЗЖ, ВГНКИ, МГУТУ им. КГ. Разумовского, Комитета ветеринарии города Москвы, Института исследований болезней птиц (США), Центральной ветеринарной лаборатории Великобритании.

Создан и действует **студенческий кружок** по молекулярной биологии, (руководитель и наставник проф. Забережный А.Д.) где проводится изучение молекулярно-генетических характеристик возбудителей инфекционных болезней животных. Молодые ученые участвуют в полевых исследованиях для пополнения Всероссийской коллекцией постоянных линий клеток беспозвоночных, Коллекцией перевиваемых соматических культур

сельскохозяйственных и промысловых животных и Коллекцией патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных и в работе лабораторий, аттестованных Международным эпизоотологического бюро.

Сотрудники института ежегодно **участвуют в ведущих выставках** АПК России - Международной специализированной выставке животноводства и птицеводства «Агроферма» и Российской агропромышленной выставке «Золотая осень», на которой 2018 году получено 3 золотых, 5 серебряных и 1 бронзовая медаль.

За успехи, достигнутые в разработке и внедрении производство научных исследований и мероприятий по борьбе с инфекционными болезнями животных, Институт в 1971 году награжден орденом Ленина, а многие сотрудники – орденами и медалями.

За высокие показатели научно-производственной деятельности Институт занесен в книгу Почёта МГК КПСС, Моссовета, МГСПС и МГК ВЛКСМ СССР и РСФСР, оргкомитета XXI Всемирного ветеринарного конгресса и др.

Институт в 1975-1977 гг. и в 1985 г. награждался переходящим Красным знаменем и Памятным знаком ЦКВЛКСМ, СМ СССР, ВЦСПС ЦК ВЛКСМ с занесением на Всесоюзную доску Почета ВДНХ СССР.

За период работы Института учёным ВИЭВ присуждены Государственные Премии:

В **1937** г. присуждена Сталинская премия и присвоено почетное звание Лауреата Сталинской премии профессору С.Н. Муромцеву «За разработку формол-вакцины против рожи свиней».

В **1940** г. присуждена Сталинская премия 1 степени (п.5. Сельскохозяйственные науки) Скрябину Константину Ивановичу за научные работы по ветеринарной и медицинской гельминтологии: «Гельминтозы крупного рогатого скота и его молодняка», опубликованную в 1937 году; «Основы общей гельминтологии», опубликованную в 1940 году.

присуждена Сталинская премия 2 степени (п.5. Сельскохозяйственные науки) Вышелесскому Сергею Николаевичу за научные работы по изучению заразных болезней животных и за разработку методов их лечения, опубликованные в 1935-1940 годах в трудах ВАСХНИЛ и в научном труде «Частная эпизоотология», опубликованном в 1940 году.

В **1946** г. присуждена Сталинская премия и присвоено почетное звание Лауреата Сталинской премии второй степени академику ВАСХНИЛ С.Н. Муромцеву «За разработку нового метода культивирования микробов и изготовления вакцин против инфекционных заболеваний сельскохозяйственных. животных».

В **1951** г. присуждена Сталинская премия и присвоено почетное звание Лауреата Сталинской премии профессору П.С. Соломкину «За разработку метода получения сыворотки и вакцины против болезни Ауески сельскохозяйственных животных».

В **1973** г. присуждена Государственная премия СССР в области науки и техники «За создание вакцины ТФ-130 против стригущего лишая крупного рогатого скота, разработку технологии ее производства, освоение промышленного выпуска и внедрение в широкую ветеринарную практику» коллективу авторов: А.Х. Саркисову, С.В. Петровичу, Л.И. Никифорову, Л.Н. Яблочник.

В **1983** г. Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий зарегистрировал научное открытие № 278 «Свойство клеток дерматофитов (алейрий) в стадии сапрофитного роста вызывать у млекопитающих иммунитет к трихофитии» коллективу авторов: А.Х. Саркисову, С.В. Петровичу, Л.И. Никифорову, Л.Н. Яблочник.

24 июня **1983** г. академику ВАСХНИЛ А.Х. Саркисову вручена Золотая именная медаль Всемирной организации интеллектуальной собственности специализированного учреждения ООН «За создание вакцины против трихофитии крупного рогатого скота» с одновременным вручением почетных дипломов соавторам вакцины: докторам наук С.В. Петровичу и Л.И. Никифорову и канд. наук Л.Н. Яблочник.

В **1983** г. присуждена премия Совета Министров СССР в области науки и техники «За разработку комплекса средств специфической профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и внедрение его в практику животноводства» коллективу авторов: Крюкову Н.Н., Надточей Г.А., Белкиной Н.А., Зудилиной З.Ф., Шуляк А.Ф. и др.

В **1986** г. присуждена Государственная премия СССР в области науки и техники «За разработку биотехнологии и внедрение в практику высокоэффективной вакцины против тейлериоза крупного рогатого скота» коллективу авторов: Степановой Н.И., Заблоцкому В.Т., Мутузкиной З.П., Малышеву С. Н., Бурбе Г.Л. и др.

В **1986** г. присуждена премия Совета Министров СССР в области науки и техники «За разработку и внедрение в производство биотехнологической системы рационального использования стоков свиноводческих комплексов, обеспечивающих охрану природной среды» коллективу авторов: Колтыпину Ю.А., Елину Е.Н., Нерубайло И.И. и др.

В **1987** г. академику ВАСХНИЛ А.Х. Саркисову присуждена Государственная премия Эстонской ССР «За создание вакцины против трихофитии крупного рогатого скота».

В **1987** г. присуждена премия Совета Министров СССР в области науки и техники «За создание высокоиммуногенной антирабической вакцины, организацию и внедрение специфической профилактики бешенства сельскохозяйственных животных в СССР» коллективу авторов: Ведерникову В.А. и др.

В **1989** г. присуждена премия Совета Министров СССР в области науки и техники «За создание эффективных средств и методов специфической профилактики и диагностики вирусных болезней лошадей, освоение

промышленного производства и внедрение их в практику» коллективу авторов: Крюкову Н.Н., Юрову К.П., Ярных Е.В., Дьяконову Л.П. и др.

В **1990** г. присуждена премия Совета Министров СССР в области науки и техники «За разработку комплекса эффективных средств специфической профилактики наиболее опасных и массовых инфекционных болезней овец и внедрение их в практику животноводства» коллективу авторов: Караваеву Ю.Д., Шубину В.А., Семеновой И.Н., Сидорчук А.А., Панасюк С.Д., Налетову Н.И., Соколову М.Н., Степнова С. Н. и др.

В **1997** г. присуждена премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники за цикл работ «Разработка научных основ и внедрение интегрированной системы мероприятий по борьбе с болезнями пчел» коллективу авторов: О.Ф. Гробову, Ю.А. Иванову, А.Н. Сотникову, Ю.М. Батуеву и др.

В **1997** г. присуждена премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники «За разработку и создание биотехнологического производства ликопида - нового иммунокоррегирующего лекарственного препарата» коллективу авторов: Г.Ф. Коромыслову, Г.И. Устиновой и др.

С **1997** г. по **2000** г. – Государственную научную стипендию как выдающиеся ученые получали: - Овдиенко Н.П., Караваев Ю.Д., Федоров Ю.Н., Юров К.П., Шегидевич Э.А., Гулюкин М.И.

В **2000** г. присуждена премия Правительства Российской Федерации в области науки и техники «За разработку и освоение производства ветеринарных противовирусных иммуностимулирующих препаратов на основе рекомбинантных белков» коллективу авторов: Г.Ф. Коромыслову, И.Д. Фесенко, Н.Е. Курочке и др.

В 2002 году директором института был избран профессор Гулюкин М.И., который руководил институтом до сентября 2017 года, а с сентября 2017 года по настоящее время директором института работает Гулюкин А.М.

Восстановлены лаборатории болезней свиней – зав. лабораторией проф. Алипер Т.И. и болезней птиц - зав. лабораторией проф Рождественская Т.Н.

В **2002** г. присуждена Государственная премия Республики САХА (Якутия) в области сельского хозяйства за работу «Разработка комплекса эффективных средств и методов специфической профилактики и лечения некробактериоза северных оленей и внедрение их в практику животноводства Республики Саха (Якутия)» коллективу авторов: Караваеву Ю.Д., Семеновой И.Н. и др.

В **2004** г. присуждена Государственная премия Республики Саха (Якутия) в области науки и техники за разработку вакцины против мыта лошадейколлективу авторов: Юрову К.П. и др.

С **2002 по 2017** год (период руководства М.И. Гулюкина) институт получил 57 дипломов ВВЦ, награжден 50 медалями ВВЦ-ВДНХ, из них: 20 золотых, 19 серебряных, 11 бронзовых.

За достижения в области сельского, водного и лесного хозяйства Президиум РАСХН утвердил Золотые медали имени ряда выдающихся учёных, которые присуждаются один раз в три года. Так, золотой медалью имени С.Н. Вышелесского, которая утверждена в 1974 году, были награждены Я.Р. Коваленко (1977), Г.Ф. Коромыслов (1993), В.А.Ведерников (1996), К.Т. юров (2008), М.И. Гулюкин (2011), В.В. Макаров (2014).

Этапы становления и развития института за эти годы (120 лет) были подробно представлены в работах А.Ф. Викторова, 1927; Ф.К. Борисович, Ю.Ф. Борисович, 1959; Я.Р. Коваленко, 1968; И.В. Поддубский и соавт., 1968; М.В. Загородное, 1973; Г.Ф. Коромыслов, 1998; М.И. Гулюкин, 2008; М.И. Гулюкин, Н.Д. Кузьмина, В.Н. Скворцов, 2008, 2009, 2011.

Для ВИЭВцев всегда главным было создать выходную продукцию в виде вакцин, диагностикумов, сывороток, химиотерапевтических и лекарственных препаратов. Любой конечный продукт, разработанный сотрудниками института, всегда был востребован биологической промышленностью и практической ветеринарной службой. И в настоящее время биологическая промышленность страны выпускает и реализует для нужд ветеринарии 27 биологических препаратов (вакцин, диагностикумов, сывороток и пр.), разработанных сотрудниками: вакцина инактивированная эмульгированная против некробактериоза животных, вакцина поливалентная против пастереллеза свиней эмульгированная инактивированная, вирусвакцина против ринопневмании лошадей сухая культуральная СВ-69, антиген и антисыворотка для диагностики инфекционной анемии лошадей в РДП, ромаколлиофилизированный бактериальный препарат для профилактики колибактериоза с.-х. животных (Щелковский биокомбинат); вирусвакцина сухая культуральная против вирусной диареи крупного рогатого скота, вакцина живая против «царагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота сухая, вакцина ЛТФ-130, вакцина инактивированная, эмульгированная против парвовирусной болезни свиней (Ставропольская биофабрика); вакцина против гриппа лошадей инактивированная поливалентная, маллеин, туберкулин (ППД) для млекопитающих, набор антигенов и сыворотка для диагностики гриппа лошадей, набор для серологической диагностики лейкоза КРС в РИД (Курская биофабрика).

Коллектив института с благодарностью отмечает известных организаторов ветеринарной науки, руководившие деятельностью ветеринарной лаборатории МВД и института в разные годы и много сделавших для развития и становления ВИЭВ, это ученые - И.И. Гордзялковский (1898 - 1902 гг.); М.Н. Тартаковский (1902 - 1907 гг.); И.М. Садовский (1907 - 1911 гг.); С.Н. Павлушков (1911 - 1921 гг.); Д.С. Руженцов (1921-1922 гг.); Н.Д. Балл (1922 - 1924 гг.); С.И. Драчинский (1924 - 1927 гг.); С.Н. Вышелесский (1927 - 1928 гг.); Е.А. Шемиот-Полочанский (1928 - 1931 гг.); А.В. Недачин (1931 г.); К.Г. Мартин (1933 -1936 гг.); М.А. Агульник (1937 - 1938 гг.); Н.И. Леонов (1938 - 1955 гг.); Я.Р. Коваленко (1955 - 1977 гг.); Г.Ф. Коромыслов (1977 - 2002

гг.); М.И. Гулюкин (2002 – 2017 гг.); А.М. Гулюкин (2017 - по настоящее время).

И все-таки, нельзя не отметить те основополагающие направления в развитии ветеринарной и биологической науки, которые неразрывно связаны с отечественными общепризнанными научными школами Н.Ф. Гамалея, С.Н. Вышелесского, С.Н. Муромцева, К.И. Скрябина, А.Н. Баха, И.И. Иванова, М.П. Тушнова, Л.А. Зильбера, Н.А. Сошественского, Д.А. Цуверкалова, А.А. Маркова, А.П. Уранова, Р.А. Циона, П.С.Соломкина, М.К. Юсковца, Н.И. Леонова, П.В. Сизова, Я.Р. Коваленко, А.Х. Саркисова, А.Л. Скоморохова, Н.М. Комарова, И.В. Поддубского, Ф.А. Терентьева, Н.М. Климова, В.Е. Щуревского, Е.С. Орлова, А.М. Лактионова, П.А. Волоскова, А.Л. Зотова, П.П. Вишневского, А.А. Кудрявцева, М.Д. Полыковского, Б.Г. Иванова, Д.Д. Полоза, Н.Н. Михайлова, И.В. Абрамова, Т.П. Кудрявцевой, А.В. Акулова, И.А. Гусынина, И.Н. Казанского, В.С. Киселева, А.В. Прохорова, П.В. Филатова, Л.Г. Бурбы, В.А. Горбатова, М.А. Сидорова, Н.И. Степановой, Н.Н. Крюкова, Г.А. Грошевой, О.А. Поляковой, П.И. Притулина, В.Т. Круглова, Н.И. Рудикова, А.И. Канаева, Э.А. Шегидевича, П.М. Свинцова, А.Я. Фоминой, П.А. Макарова, И.В. Сидорова, Ю.Д. Караваева, Н.П. Овдиенко, В.А. Шубина, Б.Г. Орлянкина, Н.П. Головиной, Е.Т. Тришкиной, П.С. Уласевича, В.М. Нахмансона, Л.С. Ратнера, СВ. Петровича, И.С. Парфенова, П.А. Карташова, А.В. Голикова, А.Ф. Валихова, А.А. Позднякова, М.Ф. Игрицкой, М.А. Лучко, В.Т. Заблоцкого, И.Д Фесенко, Н.Е.Курочка, Л.П. Дьяконова, Н.А. Казакова и других.

Свой определенный вклад в развитие ВИЭВ внесли известные ученые ветеринарной науки, руководившие научной деятельностью института в разные годы и при этом выполнявшие колоссальный объем работы, подчас незаметный для постороннего взгляда, но очень необходимый для коллектива института. Это заместители директора по научной работе: В.В. Аликаев, А.П. Зотов, И.В. Абрамов, А.Г. Малахов, Н.Н. Михайлов, П.А Карташов, А.Т. Семенюта. СВ. Петрович, Н.П. Овдиенко, Б.В. Соловьев, В.В. Субботин, А.Д. Забережный. Учёные секретари института: Г.А. Михальский, С.К. Михайлов, П.А. Кириллов, М.В. Загороднов, Б.Ф. Звонцов, С. Рогожин, А.И. Коропова, В.В. Калугин, Н.В. Данилевская, Н.И. Ложкова, И.В. Полякова, Ю.Г. Исаев, которые также возглавляли научно-организационный отдел. В отдел входили и входят заведующий аспирантурой, редактор, патентовед, переводчики. Работу по изобретательству, лицензированию и патентованию научных разработок в стране и за рубежом проводили Л.В. Ковалев, Г.Н. Стрельникова, в настоящее время – В.И. Свиридова и С.А. Федоров. Научно-технические достижения института на выставках, конференциях, совещаниях представляются также В.И. Свиридовой, а научная библиотека института – В.С. Худяковой.

Без преувеличения, надо отметить вклад в развитие ветеринарной лаборатории МВД и ВИЭВ тысяч сотрудников разных поколений, фамилии и имена которых невозможно назвать в одной статье.

В 2018 году на базе Института создано Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», в который вошли Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии и Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений.

Нынешний юбилейный год дает право оглянуться назад. Подвести итоги, проанализировать, взвесить, дать оценку еще одного этапа в жизни института. За 120 лет своего существования, институт накопил солидный багаж открытий, достижений, знаний и опыта. На протяжении всего времени сотрудники решали и решают актуальные теоретические и практические вопросы, проводят исследования по фундаментальным и приоритетным прикладным исследованиям по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса в Российской Федерации, разрабатывают и совершенствуют научно обоснованные системы профилактики и борьбы с наиболее распространенными и экономически важными инфекционными и инвазионными болезнями сельскохозяйственных животных, рыб и пчел (туберкулез, бруцеллез, лейкоз, болезни молодняка, протозойные болезни, прионные инфекции и др.), конструируют и разрабатывают новое поколение лечебных, диагностических и профилактических биопрепаратов, схемы их применения на основе достижений современной биотехнологии.

Подводя итоги деятельности Института, можно быть уверенным в том, что коллектив учёных института и в дальнейшем будет с гордостью нести имя флагмана отечественной ветеринарной науки – Всесоюзного ордена Ленина научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко.

УДК 619:616.98:5786636.22/.28

СИСТЕМНЫЙ КОНТРОЛЬ РАСПРОСТРАНЕННЫХ И ЭМЕРДЖЕНТНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЛОШАДЕЙ

Юров К.П., доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией вирусологии, konstyurov@yandex.ru;

Алексеенкова С.В., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии, 116176@mail.ru;

Мникова Л.А., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии, mnikla293@mail.ru;

Ишкова Т.А., научный сотрудник лаборатории вирусологии, tisha-28@mail.ru

ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук, 109428, Россия, Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел. 8(495) 970-03-68.

Аннотация. Выполнены приоритетные исследования по диагностике распространенных и новых нетипичных вирусных инфекций КРС и лошадей. Идентифицированы возбудители - рота- , коронавирусы, вирус диареи-болезни слизистых КРС, альфагерпесвирус 5 КРС, выделенные во время острых вспышек респираторной инфекции у телят. Сравнение нуклеотидной последовательности гена гликопротеина S (gpS) респираторных изолятов коронавируса КРС и референтных штаммов того же вируса, зарегистрированных в INSDC, показал его сходство с коронавирусом, обнаруженным в фекалиях оленей Самбара и водяных козлов в 1994 году в США. При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности гена гли-

копротеина В изолятов альфагерпесвируса КРС с зарегистрированными в INSDC, установлено их сходство с эпизоотическими штаммами герпесвируса КРС типа 5: «SV507/99» (AY261359), «N565» (AF091605); а также герпесвируса буйволов типа 1 - «Buffalo» (AF359760), выделенными в 1999 году в Бразилии и Швеции при изучении менингоэнцефалитов у телят. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что в ряде регионов РФ имеет место интродукция в популяцию домашнего скота измененных вариантов герпес- и респираторных штаммов коронавирусов КРС, вызывающих острые вспышки заболевания. Изолированы штаммы вируса гриппа лошадей H3N8, вызвавшего панзоотию в 2007 – 2008 гг. и эпизоотические штаммы, ранее изолированные на территории СССР и РФ в период эпизоотий 1968-72, 1974, 1982-85 гг. Выполнены исследования по идентификации изолятов гаммагерпесвируса лошадей типа 5 при заболевании лошадей с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких - ХОБЛ. Результаты экспериментальных исследований по проблеме желудочно-кишечных инфекций: рота-, корона-, пестивирусов - позволили создать научную и материальную базу в виде диагностических и вакцинных препаратов, нормативных документов для борьбы с массовыми и экономически значимыми вирусными болезнями молодняка КРС.

Ключевые слова: альфагерпесвирус, грипп, фиброз легких, ротавирус, коронавирус

Systemic control of common and emergent viral infections of cattle and horses

Yurov K.P., Alekseyenkova S.V., Mnikova L.A., Ishkova T.A.

Federal Research Center - All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Russia, Moscow, Ryazanskiy prospect, 24, bldg. 1, tel. 8 (495) 970-03-68.

Annotation. Priority studies have been performed to diagnose common and new atypical viral infections in cattle and horses. The pathogens – bovine coronaviruses, diarrhea virus, bovine alphaperpesvirus type 5 isolated during acute outbreaks of respiratory infection in calves were identified. Comparison of the nucleotide sequence of the glycoprotein S (gpS) gene of respiratory isolates of bovine coronavirus and reference strains of the same virus registered in INSDC showed its similarity with coronavirus found in the feces of Sambar deer and water goats in 1994 in the USA. In a comparative analysis of the nucleotide sequence of the glycoprotein B gene of isolates of alphaherpesviruses of cattle with registered in INSDC, their similarity to epizootic strains of BoHv5 was established: "SV507 / 99" (AY261359), "N565" (AF091605); as well as herpesvirus buffalo type 1 - Buffalo (AF359760), isolated in 1999 in Brazil and Sweden in the study of meningoencephalitis in calves. The obtained results allow to draw a conclusion that in some regions of the Russian Federation there has been introduced into the population of livestock the altered variants of herpes- and respiratory strains of coronaviruses that cause acute outbreaks of the disease in cattle. The strains of the H3N8 equine influenza virus, which caused panzootia in 2007-2008, were isolated and epizootic strains previously isolated on the territory of the USSR and Russia during the epizootics of 1968-72, 1974, 1982-85. Studies on the identification of Gammaherpesvirus isolates of type 5 horses for horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) were performed. The results of experimental studies on the problem of gastrointestinal infections: rota-, corona, and pestiviruses-have made it possible to create a scientific and material basis in the form of diagnostic and vaccine preparations, regulatory documents for combating the massive and economically significant viral diseases of young cattle.

Key words: alphaherpesvirus, influenza, pulmonary fibrosis, rotavirus, coronavirus

1. Введение. Расширение международных экономических связей, интенсивный завоз племенных животных создаёт серьёзную угрозу заноса и распространения новых инфекционных заболеваний животных. В связи с этим основным звеном в системе профилактических мероприятий является своевременная и достоверная диагностика, основанная на разработке нового поколения средств и диагностических тестов, включающих современные методы молекулярной и иммунологической диагностики, создание эффективных средств специфической профилактики

2.Результаты и обсуждение.

2.1.Идентификация альфагерпесвирусов и коронавирусов КРС.

В ряде стран, экспортирующих в Российскую Федерацию племенной скот и продукты животноводства: Бразилии, Аргентине, США, Венгрии, Италии, Австралии - ведущее место среди всех причин респираторных и неврологических расстройств крупного рогатого скота (КРС) занимает альфагерпесвирусная инфекция 5. Прототипными вирусами являются штаммы «N569» и «A663» и Бразильские изоляты. Болезнь часто характеризуется высокой летальностью. Однако после заражения в естественных или экспериментальных условиях заболевают не все животные. В некоторых случаях у инфицированных телят наблюдают лёгкую дисфункцию ЦНС с последующим выздоровлением. Один и тот же штамм способен вызвать смерть новорождённых телят и бессимптомную инфекцию у телят первых месяцев жизни. Зараженные животные могут оставаться бессимптомными вирусоносителями. Манифестная инфекция развивается в случае иммуносупрессии под воздействием стресса, суперинфицирования другим возбудителем и др. В случае продуктивной инфекции симптомы болезни появляются на 9 – 13 день после заражения и наблюдаются от 12 часов до 3 суток. Болезнь, как правило, заканчивается летальным исходом. Невро-

логические расстройства включают депрессию, извращение аппетита, слепоту, гипотонию языка, скрежет зубами, атаксию, потерю ориентации, слюнотечение, клонические и тонические судороги, парез, оглум.

В период острых вспышек респираторной инфекции телят в ряде регионов европейской части РФ идентифицированы изоляты герпесвируса КРС, отличные от известных ранее. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена гликопротеина B (gpB) новых изолятов с зарегистрированными в INSDC вирусами, показал их сходство с эпизоотическими штаммами герпесвируса КРС типа 5: «SV507/99» (AY261359), «N565» (AF091605); а также герпесвируса буйволов типа 1 - «Buffalo» (AF359760), выделенными в 1999 году в Бразилии и Швеции при изучении менингоэнцефалитов у телят. Сходство исследуемых полевых изолятов и референтных штаммов герпесвируса КРС типа 5 и герпесвируса буйволов типа 1 составляло 99,4 – 98,1 и 98,6 – 97,8% соответственно [3].

Продолжением исследований явилась работа по расшифровке этиологии респираторного заболевания телят, в результате которой установлено распространение респираторного варианта коронавируса КРС. Сравнение нуклеотидной последовательности гена гликопротеина S (gpS) эпизоотических изолятов коронавируса КРС и референтных штаммов того же вируса, зарегистрированных в INSDC, показал его сходство с коронавирусом, обнаруженным в фекалиях оленей Самбара и водяных козлов в 1994 году в США. Таким образом, результаты, полученные нами, позволяют сделать заключение, что в ряде регионов РФ имеет место интродукция в популяцию домашнего скота новых измененных вариантов герпес- и респираторных штаммов коронавирусов КРС.

2.2. Гаммагерпесвирус типа 5 лошадей и его роль в патогенезе хронической респираторной патологии.

Герпесвирусы лошадей 2-го и 5-го типов отнесены к подсемейству гаммагерпесвирусов. Впервые латентный ГВЛ5 у жеребят с респираторным синдромом обнаружили австралийские учёные M. J. Studdert, A. J. Turner и J. E. Peterson в 1970 году [9]. K. J. Wiiliams с соавт. (2007) описали ГВЛ5 в качестве возбудителя интерстициальной пневмонии и мультинодулярного фиброза лёгких лошадей [10]. В СССР латентный герпесвирус лошадей был идентифицирован К. П. Юровым с соавт. в 1974 году как вирус второго типа.

В связи с распространением в коневодческих хозяйствах заболевания с симптомокомплексом хронической обструктивной пневмонии, этиология которого остаётся предметом дискуссий, использовали ряд методов: вирусологические, молекулярно-генетические - ОТ-ПЦР и ПЦР [2], а также серологические - ИФА и РНГА для выявления антител к вирусу гриппа лошадей H3N8; РН и ИФА для диагностики ринопневмонии [7]; РН для диагностики вирусного артериита. У жеребят и молодых лошадей ХОБЛ характеризуется симптомами угнетения, отрывистого кашля, высокой постоянного типа лихорадкой, обильными выделениями из носовых отверстий, вначале серозно-слизистыми, затем слизисто-гнойными. У лошадей старшего возраста отмечают прогрессирующие симптомы: одышку, кашель и слизисто-гнойные выделения из носовых отверстий, рецидивирующую лихорадку, исхудание. У отдельных лошадей - кожную сыпь, диарею. Результаты исследований позволили сделать заключение о наличии в анамнезе лошадей с симптомами ХОБЛ нескольких вирусов – возбудителей заболеваний, а именно: ГВЛ5 – 75%, ГВЛ4 – 25, риновирус А (рино А) – 16,6 %, вирус артериита лошадей (ВАЛ) - 8,3% , ГВЛ1 – 8,3%. Следовательно инфекция вируса герпеса лошадей 5 могла наблюдаться в форме моноинфекции или смешанной инфекции с ГВЛ4, ГВЛ1, ВАЛ, Рино А. У тех же лошадей исключены ГВЛ2, аденовирус лошадей типа 1, риновирус типа

В, вирус гриппа лошадей H3N8. Таким образом, полученные результаты позволяют отнести ГВЛ5 к числу облигатных патогенов респираторного тракта лошадей. Нельзя исключать участие в патологии вирусов ринопневмонии, артериита, риновируса А. В двух случаях ГВЛ5 был обнаружен в органах абортированного плода и новорожденного жеребенка, павшего с симптомами острой диареи [4].

2.3. Эволюция вируса гриппа лошадей, совершенствование специфической профилактики инфекции.

Грипп лошадей остается одной из серьезных проблем для коневодства многих стран. Основным возбудителем в настоящее время является вирус гриппа лошадей 2-го подтипа – H3N8. Вспышки характеризуются периодичностью в 5-12 лет, что обусловлено высокой антигенной изменчивостью возбудителя. Эпизоотические штаммы принято разделять соответственно структуре их генома на два генотипа: Европейский и Американский. Последний делится на три линии: Кентукки, Флорида (сублинии 1 и 2) и Аргентина. Последнюю панзоотию 2007 – 2008 гг., в которую были вовлечены США, Австралия, Индия, Китай, Монголия и др. страны, вызвал вирус Американского генотипа линии Флорида. В течение панзоотии кроме естественного хозяина – лошадей, болели животные других видов: ослы, лошади Пржевальского, свиньи и домашние собаки.

Проведен сравнительный геномный анализ штаммов вируса гриппа лошадей (H3N8), выделенных нами в 2007-08 гг., изолята 2011 года и штаммов, ранее циркулировавших на территории СССР и РФ в период эпизоотий с 1969 по 1995 гг. Расшифрована нуклеотидная последовательность генов, кодирующих нуклеопротеин и гемагглютинин, и проведён их сравнительный филогенетический анализ. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей сегмента НА штамма «A/equine/Oryol/34/70» (H3N8), выделенного первым в СССР, и известных штаммов вируса гриппа лошадей H3N8

с помощью компьютерной программы «FASTA3» показал наибольшее сходство с группой вирусов, выделенных в Японии в 1971 году: «A/equine/Sachiyama/1/71» (H3N8) и «A/equine/Tokyo/2/71» (H3N8) (сходство 98,9 и 98,8% соответственно) и штаммом, выделенным в Алжире в 1972 году – «A/equine/Algiers/1/72» (H3N8) (сходство 97,4%). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей сегмента NP этого же вируса показал наибольшее сходство с вирусами «A/equine/Sachiyama/1/71» (H3N8) и «A/equine/Tokyo/2/71» (99,5%), а также с прототипным вирусом H3N8 - «A/equine/Miami/63» (98,3%) [6]. Типичный штамм «A/equine/Bitsa/2007» передан на Курскую биофабрику для использования в составе поливалентной вакцины против гриппа лошадей.

2.4. Диагностика и профилактика инфекционной анемии лошадей

Внедрена комплексная диагностика инфекционной анемии лошадей на основе «золотого стандарта МЭБ» - реакции диффузионной преципитации (тест Коггинса) и альтернативных тестов - ИФА, иммуноблотинга и ОТ-ПЦР с вложенной парой праймеров (nested RT-PCR). Соответственно международным требованиям разработаны мероприятия по профилактике и борьбе с болезнью [5].

2.5. Разработка и внедрение вакцин и диагностикумов вирусных желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота.

Одну из наиболее экономически значимых проблем для животноводческих хозяйств РФ представляют желудочно-кишечные болезни молодняка КРС, которые вызываются рота-, корона-, пестивирусами. Ротавирус поражает тонкий отдел кишечника у телят первых дней жизни. Для кишечной формы коронавирусной инфекции характерна патология толстого отдела кишечника телят в возрасте старше 8-10 дней [1]. Вирус диареи вызывает воспаление желудочно-кишечного тракта у телят, инфицирует плод внутриутробно, проникая через пла-

центу, нарушает воспроизводительную функцию коров, вызывает аборты или рождение персистентно инфицированных телят [8].

Полученные в лаборатории результаты позволили создать научную и материальную базу в виде диагностических и вакцинных препаратов, нормативных документов инструкций, для борьбы с распространенными вирусными болезнями КРС. Все разработки, которые приводятся ниже, прошли в установленном порядке апробацию и утверждение - Набор для диагностики ротавирусного энтерита КРС методом иммуноферментного анализа «РОТА-ИФА-ВИЭВ», Набор для диагностики коронавирусного энтерита КРС методом гемагглютинации, Набор для диагностики вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ВД-БС-ИФА-ВИЭВ», Набор для дифференциальной диагностики рота-коронавирусного энтеритов и вирусной диареи крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «РОДИКОР-ТЕСТ ВИЭВ», Набор для выявления антител к рота-, коронавирусам и вирусу диареи крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «АНТИТЕЛА-РОДИКОР-ИФА-ВИЭВ». Приоритет подтверждён авторскими свидетельствами, патентами [2]. Внедрены в производство «Вакцина инактивированная гидроокисьалюминиевая против коронавирусного энтерита крупного рогатого скота «КОР-ВАК-ВИЭВ», Вакцина инактивированная гидроокисьалюминиевая против ротавирусного энтерита крупного рогатого скота «РОТАВАК-ВИЭВ», Вакцина инактивированная против рота, корона и вирусной диареи крупного рогатого скота «РОДИКОР-ВАК». В период 2016-2018гг. изготовлены лабораторные серии вакцины с включением бактерийного компонента – E. Coli - и испытаны в условиях неблагополучных хозяйств. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой иммуногенности этого препарата. Приоритет разработки подтвержден

решением ФИПС - Уведомление о положительном результате экспертизы на изобретение «Вакцина против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза КРС» от 19.06.2018.

Литература

Авилов В.С., Гоголев М.М., Матюгина Н.И., Мникова Л.А., Марчук А.Т. Инфекционные энтериты новорожденных телят рота- и коронавирусной этиологии // Бюллетень ВИЭВ. М., 1982. - Вып. 47. - С. 9-13.

Мникова Л.А., Гоголев М.М., Жидков С.А., Ишкова Т.А. Способ серологической диагностики вирусных желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа. Патент № 2472162, 2013 г.

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.

Юров К.П., Алексеенкова С.В., Юров Г.К. Герпесвирус лошадей типа 5 – возбудитель фиброза легких // Ветеринария - 2013. - № 3. - С. 17 - 21.

Юров К.П., Алексеенкова С.В., Юров Г.К. Инфекционная анемия лошадей и ее современная диагностика // Ветеринария - 2013. - № 4. - С. 3-6.

Юров К.П., Алексеенкова С.В., Юров Г.К. Эволюция вирусов гриппа лошадей на территории СССР и РФ// Ветеринария – 2012. – № 11. – С. 19 - 25.

Юров К.П., Крюков Н.Н. Ринопневмония лошадей // Коневодство и конный спорт - 1969. - № 12. - С. 31-32.

Юров К.П. Филодинамика пестивирусов жвачных // Российский ветеринарный журнал – 2018. - № 1. – С. 5 – 8.

Studdert M.J., Turner A.J., Peterson J.E. Equine herpesviruses. Isolation and characterization of equine rhinopneumonitis virus and other equine herpesviruses from horses // Australian Vet. J. 1970. Vol. 46. P. 83 - 89.

10) Williams K.J., Maes R., Del Piero F., Lim A. et al. Equine multinodular pulmonary fibrosis: a newly recognized herpesvirus -associated fibrotic lung disease//Vet. Pathol. 2007. Vol. 44 (6). P. 849 -862.

УДК 619:616.98:578.824.11

ПРЯМОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Анисина О.В. – кандидат биологических наук, заведующая отделом производственной санитарии ФГБНУ ВНИТИБП,

e-mail: anisina-olga@mail.ru

Клюкина В.И. – доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом иммунологии ФГБНУ ВНИТИБП,

e-mail: vnitibp-immunology@mail.ru

Святенко М.С. – научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ ВНИТИБП, e-mail: vnitibp-immunology@mail.ru

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 141142, Россия, Московская область, п. Биокомбината, д.17, тел. 8(496)567-32-63, e-mail: vnitibp@mail.ru

Аннотация. Разработанная экспериментальная иммунохроматографическая тест-система (ИХА) на нитроцеллюлозных мембранах, предназначена для быстрого выявления вируса бешенства в пробах ткани мозга лабораторных животных и пробах слюны, содержащих вирус бешенства штамм «CVS». В качестве специфического компонента в тесте ИХА использован конъюгат IgG антитела к нуклеопротеиновому комплексу вируса бешенства с частицами коллоидного золота (КЗ-АТ). Показана 100%-ная специфичность теста ИХА при исследовании проб ткани мозга с пределом обнаружения 2,0 LD_{50}/0,03 мл.

Ключевые слова: вирус бешенства, нуклеопротеин, антитела, иммунохроматография, экспресс анализ, диагностика.

DIRECT IMMUNCHROMATOGRAPHIC METHOD OF DETECTING THE RABIES VIRUS

Anisina O.V., Klyukina V.I., Svyatenko M.S.

FGBNU All-Russian Research and Technology Institute of Biological Industry, 141142, Russia, Moscow Region, Biokombinata, 17, tel. 8 (496) 567-32-63, e-mail: vnitibp@mail.ru

Abstract. The developed experimental immunochromatographic test system (ICA) on nitrocellulose membranes, is designed to quickly identify the rabies virus in brain tissue samples of laboratory animals and saliva samples containing the rabies virus. As specific component in the ICA, an IgG antibody conjugate used to the nucleoprotein complex of the rabies virus with colloidal gold particles. A 100% specificity of the ICA test is shown when examining samples of brain tissue with a detection limit of 2,0 LD_{50}/0,03 ml.

Введение. Бешенство – смертельная энзоотическая болезнь, вызываемая вирусом бешенства RABV, род Lyssavirus, семейство Rhabdoviridae. Вирус бешенства состоит из пяти структурных белков, два из которых нуклеопротеин (N- белок), общий для Lyssavirus генотипа 1, и гликопротеин (G) – ответственный за формирование иммунитета после вакцинации, нашли широкое применение при конструировании экспресс-методов для диагностики и оценки эффективности антирабической вакцинопрофилактики [1, 2, 3]. Вирус бешенства смертельно поражает широкий круг млекопитающих, включая человека. В каждом регионе мира сформирован свой основной резервуар и/или свои передатчики бешенства, включая лис, енотов, летучих мышей, собак. Первичная диагностика бешенства основана часто на клинических проявлениях, но окончательный диагноз может быть поставлен исследованием ткани мозга лабораторными методами, стандартизованными документами ВОЗ и МЭБ. «Золотой стандарт» – метод иммунофлюоресценции (МФА), для

большого числа образцов при эпидемиологическом исследовании – иммуноферментный метод (ИФА) обеспечивают получение результата в течение 2 – 4час в 98 – 100% случаев для всех генотипов Lyssavirus. Появление вируса в слюне больного бешенством животного до проявления клинических признаков делает возможность прижизненной диагностики и проведения своевременного лечения.

В настоящее время разрабатываются новые экспрессные методы диагностики, направленные на сокращение времени проведения анализа, проведения внелабораторных условиях, при увеличении надежности и простоте интерпретации результатов теста, но высокой специфичности и чувствительности. Всем этим требованиям отвечает метод иммунохроматографического анализа (ИХА) и его варианты на нитроцеллюлозных мембранах, для выявления возбудителей инфекционных болезней, таких как туберкулез, африканская чума свиней, псевдотуберкулез, а также различных токсинов [3, 4, 5]. Имеются сообщения о разработке тест-систем на основе ИХА с применением поли- и моноклональных антител, специфичных к N–белку вируса бешенства, и оценки их эффективности для диагностики бешенства [6, 7]. В связи с этим целью настоящей работы стало разработка прямого метода иммунохроматографического анализа и компонентов тест-системы для выявления вируса бешенства в пробах ткани мозга и экспериментальных пробах слюны.

Материалы и методы исследований. В работе использовали: золотохлористо-водородная кислота – $HAuCl_4$*n H_2O (ОАО «Аурат», Россия); цитрат натрия («Fluka»); протеин А–сефароза («Sigma»). В качестве специфических компонентов теста ИХА были использованы: кроличьи анти-нуклеопротеиновые IgG антитела, выделенные аффинной хроматографией на протеин А–сефарозе.

Для конструирования тест-системы ИХА использовали конъюгат анти-нуклеопротеиновых IgG антител с частицами коллоидного

золота 15 – 20 нм, который готовили по D. Brada (1984) и набор нитроцеллюлозных мембран «Advanced Mikrodevicts» (Индия); Protran BA83 «Sigma» (размер пор 0,2-0,45 мкм). Методом ИХА исследовали пробы ткани мозга мышей, павших от заражения вирусом бешенства штамм «CVS» (3,8 LD_{50}/0,03 мл) и экспериментальные пробы слюны собаки с добавлением очищенного мозгового вируса бешенства. Аналитическую чувствительность теста ИХА устанавливали двукратным титрованием проб от 3,8 lg LD_{50}/0,03 до 1,1 lg LD_{50}/0,03 мл. О наличии антигена вируса бешенства в пробе свидетельствовало появление красного пятна в тестируемой зоне. Специфичность аффинно очищенных антител устанавливали в МФА (подавление свечения вируса в мазках ткани мозга зараженных бешенством мышей) с компонентами набора «Глобулин флюоресцирующий для диагностики бешенства животных» ТУ 9388-03-00497963-97 (ФГБНУ ВНИТИБП). В качестве контроля теста ИХА использовали пробы ткани мозга от здоровых мышей и пробы слюны здоровой собаки с тканью мозга здоровых мышей.

Результаты исследований. Ранее в отделе иммунологии ВНИТИБП разработана технология получения иммунохроматографической тест-кассеты, в которой проба после нанесения связывалась с конъюгатом антинуклеопротеиновых антител и коллоидного золота и по мере продвижения на мембране появляется окрашивание в тестовой зоне и в контрольной зоне, что свидетельствует о положительном результате исследования выявление вируса бешенства в пробе [8]. С целью совершенствования метода ИХА разработана и оценена тест-система прямого ИХА одностадийного выявления антигена вируса бешенства путем нанесения пробы ткани мозга и слюны на нитроцеллюлозную мембрану с сорбированным конъюгатом антинуклеопротеиновых IgG антител с частицами коллоидного золота.

На первом этапе разработки прямого теста ИХА нам необходимо было оценить специфичность антинуклеопротеиновых IgG антител после очистки их методом аффинной хроматографии. С этой целью антинуклеопротеиновые IgG антитела в разведении 1:50 до 1:800 исследовали в тесте подавления свечения вируса бешенства в мазках ткани мозга зараженных мышей методом иммунофлюоресценции (таблица 1).

Таблица 1. Специфичность антинуклеопротеиновых антител в МФА

Материал	Разведения / % подавления				
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Антинуклепротеиновая сыворотка кролика	100	100	100	60	20
Глобулиновая фракция кроличьей антинуклеопротеиновой сыворотки (70 мг/см^3)	100	100	100	80	50
Аффиноочищенные антинуклеопротеиновые IgG антитела (3,5 мг/см^3)	100	100	100	100	60

Данные, представленные в таблице, показывают, что полученные нами аффинно очищенные антинуклеопротеиновые IgG антитела сохранили специфическую активность и подавляли специфическое свечение вируса бешенства в мазках ткани мозга мышей в максимальном разведении 1:400. Для синтеза стабильного без агрегации конъюгата с частицами коллоидного золота определяли оптимальную дозу антинуклеопротеиновых IgG антител титрованием в U-лунках планшета в диапазоне 5-350 мкг/см^3 с 1,0 см^3 золя коллоидного золота (A_{520} –1,0), которая составила – 100 мкг. Готовый конъюгат стабилизировали 15% бычьим сывороточным альбумином (БСА), консервировали 0,01% азидом натрия и хранили при 4°C в течение года (срок наблюдения).

Оптимальная концентрация КЗ-АТ на нитроцеллюлозную мембрану, установленная по интенсивности окрашивания двойных разведений конъюгата с 30% пробой ткани мозга зараженных вирусом бешенства мышей, составила 90 мкг/см^3. Для изготовления ИХА тест-полосок нитроцеллюлозную мембрану (10х10 см) разбивали на равные квадраты, в центр каждого точечно методом пропитывания наносили 20 мкл/см^2 КЗ-АТ, высушивали при комнатной температуре в течение 8-12 часов при 20С^o или 4 часа при 37С^o. Готовую мембрану при необходимости нарезали на полоски, плотно упаковывали и хранили при 20±0,2^{o}С без доступа влаги с силикогелевым осушителем.

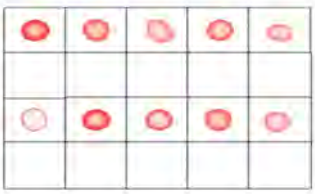
Пробоподготовка для исследования методом ИХА предусматривала гомогенизацию проб ткани мозга и слюны в лизирующем трис-HCI буфере рН 8,0±0,2 с тритоном Х-100 и додецилсульфатом натрия (1:1) с целью извлечения антигенов вируса бешенства, с последующим точечным нанесением 20 мкл надосадка на иммунохроматографический тест. Положительным результатом считали появление розовато-красного пятна в зоне нанесения испытуемой пробой, что свидетельствовало о наличии антигена вируса бешенства. На рис.1 представлены примеры тестирования проб ткани мозга и экспериментальных проб слюны с целью оценки чувствительности (предел обнаружения) прямого метода ИХА при выявлении антигена вируса бешенства.

Рис.1 Чувствительность прямого теста ИХА: А - проба ткани мозга в разведении; В - проба слюны собаки с вирусом бешенства в

разведении; С - контроль (ткань мозга здоровых мышей); Д - контроль (слюна собаки с тканью мозга здоровых мышей).

Из данных следует, что прямой тест ИХА позволяет выявить вирус бешенства до 2,0 LD_{50}/0,03 мл в пробе ткани мозга мышей, и до 2,3 LD_{50}/0,03 мл в экспериментальных пробах слюны, при отсутствии окрашивания с контрольными образцами.

Эффективность прямого ИХА оценивали исследованием 5 пробы ткани мозга и 5 проб слюны, содержащих вирус бешенства и контрольных проб (рис.2).



А - пробы ткани мозга мышей;
В - контроль (ткань мозга здоровых мышей);
С - пробы слюны собаки с вирусом бешенства;
Д - контроль (слюна собаки с тканью мозга здоровых мышей).

Рис.2 Эффективность прямого теста ИХА при выявлении вируса бешенства

Данные, представленные на рис. 2 наглядно показывают зависимость интенсивности окрашивания от концентрации вируса в пробе. Нами исследованы в тесте прямого ИХА пробы ткани мозга зараженных мышей от 30-5% концентрации (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность прямого теста ИХА

Исследуемый материал	Проба в трис-HCl буфере (1:1)/%				
	30%	20%	15%	10%	5%
Проба ткани мозга зараженных мышей	4+	4+	2+	+	+
Слюна собаки с вирусом бешенства	4+	2+	+	+	-

Характер интенсивности: 4+ яркая; 2+ умеренная; + слабая

Как следует из представленных данных, интенсивность окрашивания находится в прямой зависимости от количества вируса в пробе. Нанесение на тест полоску пробы ткани мозга зараженных мышей в концентрации 30-15% формировало максимальную интенсивность окрашивания (4+), пробы слюны собаки с вирусом бешенства в концентрации 30-20%.

Заключение. В результате проведенных исследований разработан и испытан прямой иммунохроматографический тест на основе конъюгата антинуклеопротеиновых IgG антител с частицами коллоидного золота для выявления вируса бешенства. Чувствительность теста находится в диапазоне 2,0 LD_{50}/0,03 мл – 2,3 LD_{50}/0,03 мл для различных проб. Отсутствие промежуточных стадий, возможность визуального учета результатов в короткое время, позволяют рассматривать тест ИХА в качестве дополнительного анализа в лабораторной диагностике бешенства.

Литература

1. Самуйленко А.Я. Инфекционная патология животных / Самуйленко А.Я., Гринь С. А., Еремец В. И., Клюкина В. И. и др. // Том II. Бешенство – Москва, ВНИТИБП. – 2012. – 153 с.

2. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // OIE Terrestrial Manual, 2008. – Part 2, section 1, chapter 2.1.13. – P. 304-323.

3. С. А. Староверов. Разработка иммунозолотых диагностических систем для идентификации возбудителя туберкулеза in situ / С. А. Староверов, И.В. Видяшева, А.С. Фомин и др. // Российский ветеринерный журнал. - №2, - 2011 г., - с. 29-32

4. В.В. Цибезов. Эффективность иммунохроматографической тест-системы для быстрого выявления вируса африканской чумы свиней / В.В. Цибезов, Ю.О. Терехова, О.А. Верховский и др.// Ветеринария. - №5, - 2015 г., - с. 58-64

5. Н.В. Богачева. Разработка иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Yersinia pseudotuberculosis* серогруппы I / Н.В. Богачева, Г.Д. Елагин, Д.В. Печенкин и др. // Пробемы особо опасных инфекций. 2016; № 2. С.65–68.

6. Kang B.K. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus / B.K. Kang, J.S. Oh, C.S. Lee, [et al.] // J. Virol. Meth. – 2007. – Vol. 145. - P. 30-36.

7. Hawkes, R. A dot immunobloting assay for monoclonal and other antibodies / R. Hawkes, E. Niday, J. Gordon // Analyt. Biochem. – 1982. – Vol. 119. – P. 142-147.

8. Клюкина. В. И. Выявление антигена вируса бешенства с использованием иммунохроматографического экспресс-теста / Клюкина. В. И., Анисина О. В. // Ветеринария и кормление. – 2012. - № 6. – С. 23-24.

УДК 619:616.993.192.1

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КОКЦИДИОЗА СВИНЕЙ В СМОЛЕНСКОЙ И НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТЯХ И МЕРЫ БОРЬБЫ С НИМ

Арисов М.В., доктор ветеринарных наук, профессор РАН, руководитель филиала, заведующий лабораторией эктопаразитозов

Поселов Д.С., кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник лаборатории эктопаразитозов

Семенова Н.В., научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – 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»; 117218 г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28, Российская Федерация, телефон: 8 (499) 124-56-55

Аннотация. В настоящее время доказано присутствие тенденции распространения экстенсивности инвазий в зависимости от географических широт. Также отмечены эпизоотологические закономерности формирования паразитофауны свиней в зависимости от времени года.

В статье представлены результаты изучения распространения эймериозной инвазии свиней в свиноводческих хозяйствах Смоленской и Нижегородской областей. Приведены данные по исследованию эффективности комбинированного препарата на основе толтразурила, сульфадиметоксина и триметоприма при кокцидиозе поросят в условиях ОАО «Первомайский стекольный завод» Смоленской области и племзаводе им. Ленина Нижегородской области.

При борьбе с кокцидиозами свиней необходимо учитывать степень чувствительности кокцидий в данном хозяйстве к используемым препаратам. Ведь, как известно, к кокцидиостатикам, которые повсеместно вводят в комбикорма с профилактической целью, рано или поздно наступает резистентность.

Для мониторинга эпизоотической ситуации было обследовано по 20 животных следующих возрастных групп: поросята 0-2- месячного возраста, 2-4-месячного возраста (доращивание), молодняк 4-6 и 7-8 месяцев (откорм), ремонтные свинки, племенные хрячки, проверяемые свинки, свиноматки и хряки. Зараженность свиней разных возрастных групп определяли лабораторными исследованиями методом Дарлинга или Фюллеборна.

Анализ результатов копроскопических исследований показал, что экстенсивность инвазии в хозяйстве Смоленской области составила от 5 до 60 % в зависимости от возрастной группы, в хозяйстве Нижегородской области – от 0 до 20 %.

Опыт по изучению эффективности комплексного препарата проводили на 370 головах. Испытания показали, через 30 дней после применения препарата перорально, однократно, индивидуально в дозе 0,4 мл/кг массы тела животного (из расчета по ДВ: 20 мг/кг толтразурил; 16 мг/кг сульфадиметоксин; 3,2 мг/кг триметоприм) эффективность составила 93,4-100,0 %.

Ключевые слова: кокцидиоз, эффективность, толтразурил, свиньи.

SPREAD OF PIG COCCIDIOSIS IN SMOLENSK AND NIZHNY NOVGOROD REGIONS AND CONTROL MEASURES

Arisov M.V., Poselov D.S., SemenovaN.V.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin - Branch of the Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scien-

tific Center - All- Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterenari Medicina K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko the Russian Academy of Sciences»; 28, B. Cheremushkinskaya St., Moscow, Russian Federation, 117218, phone: 8 (499) 124-56-55

Abstract. Nowadays the trend of the spread of the prevalence depending on the geographical location is proved to be in the scientific sphere. The epizootologicallaws of formation of parasitophauna in pigs is noticed to depend on the season.

In the article we present results of the study of pigs' eimeriosis propagation in farms of Smolensk and Nizhny Novgorod regions. We present the data about efficacy of combined drug based on tolturazuril, sulfadimethoxin, trimethoprim against coccidiosis of pigs in the "PervomayskyStekolnyZavod", JST (Smolensk region) and the breeding farm named after V.I.Lenin (N.Novgorod region). In dealing with coccidiosis in pigs a degree of sensitivity of coccidium in the given household to the using drugs should be taken into account. Because it is known to develop a resistance to anticoccidial drugs, which are widely used with mixed pig feed for preventive purposes. To monitoeepizootologic conditions we studied 20 animals per age group: 0-2 month, 2-4 month, 4-6 and 7-8, adult breeding pigs and boars. We defined the level of contamination by methods of Darling or Fulleborn. Coproscopic analysis revealed that extensivness of invasion in the Smolensk farm was from 5 to 60% depending on age group and in the N.Novgorod farm – from 0 to 20% respectively. We examined the efficacy of our new compound on the group of 370 animals. The experiment showed that through 30 days after the start of oral treatment (dose 0.4 ml/kg, active substance: 20 mg/kg tolturazuril, 16 mg/kg sulfadimethoxin, 3.2 mg/kg trimethoprim) efficacy was 93.4-100%.

Key words: coccidiosis, efficacy, tolturazuril, pigs.

Введение. Согласно данным Сафиуллина Р.Т. эймериозная инвазия на территории РФ составляет около 24,3% [4]. Наиболее благополучен по эймериозу Приволжский Федеральный округ. В Центральном Федеральном округе эймерии зафиксированы в Белгородской, Ивановской, Калужской, Липецкой, Московской, Смоленской, Тамбовской и Тверской областях, экстенсинвазированность в пределах от 20,1 до 33,2% [1].

При идентификации заболевания важным звеном является правильная диагностика, которая включает форму протекания кокцидиоза и видовой состав патогенных эймерий, что в дальнейшем способствует адекватному выбору лечения и повышению эффективности противококцидиозных мероприятий всего поголовья [2, 3].

Для лечения свиней назначают различные виды препаратов: ампролиум, нифулин, химкокцид, фармкокцид, хиниофон, трихопол, ригедазол 25%-ный гранулят, салинофарм и др. [4].

Весной 2013 года с целью определения экстенсивности эймериозной инвазии в Смоленской и Нижегородской областях нами были проведены исследования на поголовье свиней в ООО «СПХ Смолмясо» СК «Катынь» и племзаводе им. Ленина. Также мы определили эффективность разработанного препарата Кокцидин 3 Д суспензия на основе толтразурила, сульфадиметоксина и триметоприма в ОАО «Первомайский стекольный завод» Смоленской области и племзаводе им. Ленина Нижегородской области.

Материалы и методы. Мониторинг эпизоотической ситуации в ООО «СПХ Смолмясо» СК «Катынь» Смоленского района Смоленской области и племзаводе им. Ленина Ковернинского района Нижегородской области проводили на животных разных возрастных групп: поросята 0-2- месячного возраста, 2-4-месячного возраста (доращивание), молодняк 4-6 и 7-8 месяцев (откорм), ремонтные свинки, племенные хрячки, проверяемые свинки, свиноматки и хряки. От

каждого животного отбирали пробы по 20 г кала, упаковывали в полиэтиленовые пакеты и этикетировали. До проведения исследований пробы хранили при температуре 2-4 °С. Зараженность свиней разных возрастных групп определяли копроскопическим флотационным методом по ГОСТ 25383-82 (СТ СЭВ 2547-80) [5].

При изучении эффективности комплексного препарата Кокцидин 3Д суспензия в хозяйстве ОАО «Первомайский стекольный завод» было обработано 30 поросят 0-1-месячного возраста, 60 поросят 1-4-месячного возраста, 50 голов молодняка 4-8 месячного возраста (откорм) и 10 свиноматок; контролем служили 10 животных. На племзаводе им. Ленина препаратом было обработано 100 поросят 0-2-месячного возраста, 200 поросят 2-4-месячного возраста и 20 свиноматок; контролем служили 20 животных.

Препарат применяли перорально, однократно, индивидуально в дозе 0,4 мл суспензии на 1 кг массы (из расчета по ДВ: 20 мг/кг толтразурил; 16 мг/кг сульфадиметоксин; 3,2 мг/кг триметоприм), но не менее 0,5 мл.

В течение всего опытного периода за животными вели наблюдения. Эффективность препаратов учитывали по результатам выборочных лабораторных исследований животных опытных и контрольных групп до и через 10, 20, 30 дней после обработки. Расчет эффективности осуществляли по типу «контрольный тест».

Результаты исследований. Полученные результаты исследований распространения эймериозной инвазии в ООО «СПХ Смолмясо» СК «Катынь» и племзаводе им. Ленина свидетельствовали о том, что кокцидиоз свиней имеет место в исследуемых хозяйствах, а при отсутствии профилактических обработок отмечается у 33% и более животных.

В свиноводческом хозяйстве Смоленской области в апреле и мае экстенсинвазированность была на уровне 5-60 % в зависимости

от возрастной группы. Наибольший процент инвазированности отмечали у поросят 1-4 месячного возраста (45-60%), у 4-8 месячных поросят – 25-35% (рис. 1).

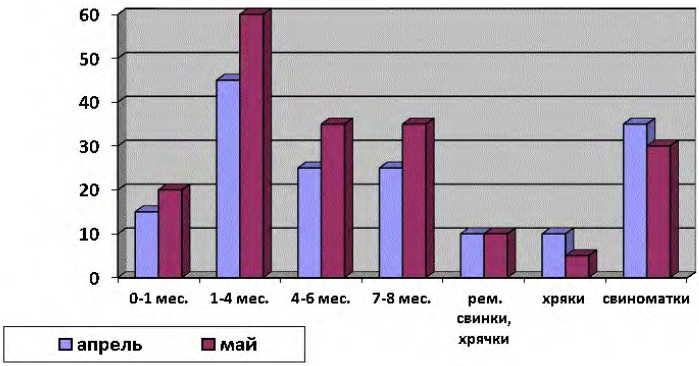


Рис. 1. Экстенсивность кокцидиозной инвазии по возрастным группам в ООО «СПХ Смолмясо» Смоленской области

У единичных животных указанных возрастных групп отмечали поносы, вялость, отставание в росте. Следует отметить, что в данном хозяйстве ветеринарно-санитарный уровень был на низком уровне, так как у хозяйства часто менялись собственники, целью которых не входило в планы развитие свиноводческого направления. При оценке результатов лабораторных исследований проб фекалий поросят, интенсивность эймериозной инвазии варьировала от 0 до 10 ооцист в камере Горяева, что указывает на низкий уровень заражения.

В племзаводе им. Ленина экстенсивность эймериозной инвазии составила 0-20% в зависимости от возрастных групп.

В апреле инвазированность поросят 0-2- и 2-4-месячного возраста составила 5% и 10% соответственно, откормочных свиней – 15%, ремонтных свинок и хрячков – 5%, хряков – 0% и свиноматок – 5%. При обследовании в мае экстенсинвазированность составила:

поросят 0-2- месячного возраста – 10%, 2-4-месячного возраста – 20%, откормочных свиней – 5%, ремонтных свинок и хрячков – 0%, хряков – 0% и свиноматок – 10%. Низкая инвазированность животных в данном хозяйстве связана с проведением плановых профилактических обработок против кокцидиоза свиней (рис. 2). Интенсивность инвазии в данном хозяйстве был от 0 до 4 ооцистэймерий - низкий уровень заражения.

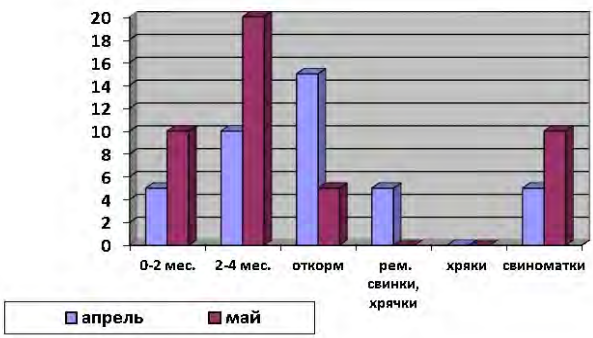


Рис. 2. Экстенсивность кокцидиозной инвазии по возрастным группам в племзаводе им. Ленина Нижегородской области

Необходимо отметить, что ветеринарные лаборатории не вносят в отчетные данные информацию по кокцидиозам свиней, так как данное заболевание клинически, в основном, не проявляется, ввиду низкого уровня зараженности животных, а в некоторых лабораториях вообще не исследуют животных на наличие кишечных паразитических простейших.

При изучении эффективности препарата Кокцидин 3Д суспензия в ОАО «Первомайский стекольный завод» по результатам выборочных копроскопических исследований установили, что экстенсинвазированность эймериями поросят 0-1-месячного возраста составила 30%, 1-4-месячного возраста – 43,3%, молодняк 4-6 и 7-8 месяцев (откорм) – 5%, ремонтные свинки и хрячки – 0%, основные

хряки – 0% и свиноматки – 30%. Интенсинвазированность эймериями составила в среднем 3,78±0,63 ооцист в камере Горяева или 4199 ооцист в 1 г кала.

Через 30 дней после назначения препарата наличие ооцистэймерий обнаружено у 2 поросят 0-1-месячного возраста и у 3 поросят 1-4 месячного возраста, у свиноматок не обнаружено. У животных контрольной группы наличие ооцистэймерий отмечено у 40% (табл. 1).

Таблица 1. Эффективность препарата Кокцидин 3Д суспензия в условиях подсобного хозяйства (Смоленская область)

Возрастная группа	Количество, гол	ЭИ, % до опыта	ЭЭ, % через 30 сут.
0 - 1 мес.	30	30	93,4
1 -4 мес.	60	43,3	95
4 - 8 мес.	50	5	100
Свиноматки	10	30	100
Контроль	10	40	-

В условиях племзавода им. Ленина экстенсинвазированность эймериями составила: поросят 0-2- месячного возраста – 10%, 2-4-месячного возраста – 20%, молодняка 4-6 и 7-8 месяцев (откорм) - 5%, ремонтных свинок и хрячков – 0%, хряков – 0% и свиноматок – 10%. Интенсинвазированность эймериями составила в среднем 1,96±0,47 ооцист в камере Горяева или 2177,56 ооцист в 1 г кала.

Через 30 дней после назначения препарата наличие ооцистэймерий обнаружено у 4 поросят 2-4 месячного возраста, у поросят 0-2-месячного возраста и у свиноматок не обнаружено. В контрольной группе наличие ооцист эймерий отмечено у 15% животных (табл. 2).

Таблица 2. Эффективность препарата Кокцидин 3Д суспензия в условиях племзавода им. Ленина (Нижегородская область)

Возрастная группа	Количество, гол	ЭИ, % до опыта	ЭЭ, % через 30 сут.
0 - 2 мес.	100	10	100
2 -4 мес.	200	20	98
Свиноматки	20	10	100
Контроль	20	15	-

При применении препарата и в течение 30 дней не отмечено каких-либо побочных явлений и осложнений.

Заключение. В хозяйствах Смоленской и Нижегородской областях имеет место наличие ооцист эймерий в фекалиях свиней. Экстенсивность эймериозной инвазии в Смоленской области составила от 5 до 60%, в Нижегородской области - от 5 до 20%. Основа успешной борьбы против кокцидиоза свиней является применение эффективных и безопасных средств. Эффективность нового комбинированного препарата Кокцидин 3Д суспензия в дозе 0,4 мл/кг массы тела животного (20 мг/кг толтразурила, 16 мг/кг сульфадиметоксина и 3,2 мг/кг триметоприма) составила 93,4-100%.

Литература

1.Палушевский А.А.Комплексный мониторинг кокцидиоза, его диагностика и профилактика / А.А. Палушевский, Н.Д. Яковлева // Птица и птицепродукты. – № 5. – 2011. – С. 47-50.

2. Сафиуллин Р.Т. Эпизоотическая ситуация и прогноз по эймериозу и балантидиозу свиней по зонам страны / Р.Т. Сафиуллин // Свиноводство. – № 3. – 2010. – С. 55-58.

3. Сафиуллин Р.Т. К диагностике кокцидиозов свиней / Р.Т. Сафиуллин //Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2015. – №16. – С. 386-389.

4. Худяков А.А.Методические положения по борьбе с кокцидиозами свиней в хозяйствах промышленного типа / А.А. Худяков, Р.Т. Сафиуллин //Российский паразитологический журнал. – 2015. – № 3. – С. 106-109.

5.ГОСТ 25383-82 (СТСЭВ 2547-80). Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики кокцидиоза.

УДК 619:616.993.192.1

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ПРИ КОКЦИДИОЗЕ СВИНЕЙ

Арисов М.В., доктор ветеринарных наук, профессор РАН, руководитель филиала, заведующий лабораторией эктопаразитозов

Поселов Д.С., кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник лаборатории эктопаразитозов

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – 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»; 117218 г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28, Российская Федерация, телефон: 8 (499) 124-56-55

Аннотация. Основой успешной борьбы против кокцидиоза свиней является применение эффективных и безопасных средств. Грамотно подобранная схема применения, а также механизм действия основных компонентов препаратов прямым образом влияют на эффективность обработки.

Своевременная ротация, а также изыскание новых препаратов имеют первостепенное значение в борьбе с кокцидиозом свиней.

Кокцидиоз широко распространен на свиноводческих фермах независимо от технологии содержания. Возбудитель заболевания рода Eimeria живет и развивается внутри клеток желудочно-кишечного тракта, разрушая их и приводя к различным симптомам, один из которых – диарея. Симптоматическая терапия не является эффективной, так как повреждение клеток кишечника является необ-

ратимым. Экономические потери свиноводов от кокцидиоза колоссальны: увеличение затрат корма на 1 кг прироста, недополучение 10–30 % прироста и гибель до 100 % молодняка. Прижизненный диагноз заболевания ставят комплексно, учитывая эпизоотологические данные, клинические признаки, патологоанатомические изменения и, главным образом, результаты исследований фекалий по одному из методов: Дарлинга, Фюллеборна или МакМастера. Если при наличии симптомов болезни находят большое количество ооцист (до 100 ооцист и более) диагноз не вызывает сомнений. Разработанный нами комбинированный лекарственный препарат Кокцидин 3Д суспензия на основе толтразурила, сульфадиметоксина и триметоприма проявил высокую эффективность в борьбе с эймериозом поросят в условиях хозяйств Смоленской и Нижегородской областей.

Для изучения эффективности комплексного препарата было обработано 170 голов в возрасте 0-4 месяца. Установлено, что при однократном пероральном применении препарата в дозах по действующим веществам - 20 мг/кг толразурила, 16 мг/кг сульфадиметоксина и 3,2 мг/кг триметоприма эффективность обработок составила 100%. Не отмечено каких-либо побочных явлений и осложнений.

Ключевые слова: кокцидиоз, эффективность, толтразурил, свиньи.

THE EFFICACY OF THE NEW COMPLEX DRUGIN TREATMENT OF COCCIDIOSIS OF PIGS

Arisov M.V., Poselov D.S.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin - Branch of the Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center - All- Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterenari Medicina K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko the Russian

Academy of Sciences»; 28, B. Cheremushkinskaya St., Moscow, Russian Federation, 117218, phone: 8 (499) 124-56-55

Abstract. The use of effective and safe compounds is the basis of successful treatment of pigs' coccidiosis. A proper treatment scheme and action mechanism as well of basic components directly affects treatment's efficacy. Timely crop rotation and development of new drugs are of paramount importance in the fight against coccidiosis in pigs.

Coccidiosis is widespread in pig farms independent of the content technology. The disease pathogen Eimeria lives and develops into the gastrointestinal tract cells, destroying them and leading to different symptoms: one of them is diarrhea. Symptomatic treatment is not effective because of the irreversible damage to gastrointestinal tract cells. The pig farmers' economic losses from coccidiosis are enormous: increasing of feed consumption per 1 kg gain, 10-30% loss of gain and death of 100% young. Diagnosis is made complex, taking into account epizootological data, clinical signs, pathologic anatomical changes and mainly results of the study of faeces according to one of the methods: Darling's, Fullenborn's or MacMaster's. If a large quantity of oocysts is found out with symptoms of the disease (100 oocysts or more), so the diagnosis is not in doubt. We have developed a combined medicament Coccidin 3D suspension based ontoltrazuril, trimethoprim and sulfadimetoksin. This drug showed high efficacy in treatment of eimeriosis of pigs in farms of Smolensk and N.Novgorod regions. 170 pigs 0-4 months were treated to study the effectiveness of the complex drug. It is established that after a single oral application of the drug in doses 20 mg/kg toltrazuril, 16 mg/kg sulfadimetoksin and 3.2 mg/kg trimethoprim efficacy of treatments was 100%. We didn't find any side effects or complications of the drug action.

Key words: coccidiosis, efficacy, tolturazuril, pigs.

Введение. На сегодняшний день для борьбы с эймериозом предложено большое количество кокцидиостатиков. Следует пом-

нить, что длительное применение одних и тех же препаратов ведет к привыканию к ним возбудителей и, как следствие, значительно снижает эффективность обработок [1,3, 4-6].

Разработанный нами и предложенный для внедрения в ветеринарную практику препарат Кокцидин 3Д суспензия содержит три действующих вещества – толтразурил, сульфадиметоксин и триметоприм. Толтразурил блокирует дыхательные ферменты и оказывает повреждающее действие на митохондрии и процессы деления ядра кокцидий, нарушая процесс формирования макрогаметоцитов, вызывает гибель паразита. Сульфадиметоксин блокирует усвоение микроорганизмами парааминобензойной кислоты и синтез фолата. Триметоприм усиливает действие сульфадиметоксина, нарушает белковый обмен и деление микробной клетки. Вещества эффективны в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [2]. Для изучения эффективности комбинированного препарата Кокцидин 3Д суспензия нами была проведена серия опытов в хозяйствах Смоленской и Нижегородской областей.

Материалы и методы. В условиях подсобного хозяйства ОАО «Первомайский стекольный завод» Смоленской области были сформированы 2 опытные группы поросят 0-1- и 1-4-месячного возраста соответственно и 2 контрольные группы поросят аналогичных возрастных групп. В опытных группах находилось по 50 голов, в контрольных – по 10. Препарат применяли поросятам опытных групп перорально, однократно, индивидуально в дозе 0,4 мл суспензии на 1 кг массы (из расчета по ДВ: 20 мг/кг толтразурил; 16 мг/кг сульфадиметоксин; 3,2 мг/кг триметоприм), но не менее 0,5 мл. Контрольным животным не применяли каких-либо химиотерапевтических препаратов.

В условиях племзавода им. Ленина Нижегородской области по результатам копроскопических исследований были сформированы4

опытные группы поросят по 20 голов в каждой: в первой и третьей опытных группах находились поросята 0-2- месячного возраста, во второй и четвертой- 2-4-месячного возраста. Также была сформирована одна контрольная группа из 20 голов, содержащая поросят 0-4-месячного возраста. Животным первой и второй опытных групп применяли Кокцидин 3 Д суспензию перорально, однократно, индивидуально в дозе 0,4 мл суспензии (по ДВ: 20 мг/кг толтразурил; 16 мг/кг сульфадиметоксин; 3,2 мг/кг триметоприм) на 1 кг массы животного, но не менее 0,5 мл. Поросятам третьей и четвертой опытных групп применяли Байкокс 5% суспензию в дозе 20 мг толтразурила на 1 кг массы животного, из расчета 0,4 мл суспензии на 1 кг массы, но не менее 0,5 мл и не более 2 мл на животное. Животные контрольной группы не получали каких-либо препаратов.

В течение всего опытного периода за животными вели наблюдения. Эффективность препаратов учитывали по результатам копроскопических исследований опытных и контрольных групп животных до и через 10, 20, 30 дней после обработки. Расчет эффективности препаратов проводили по типу «контрольный тест».

Результаты исследований. В хозяйстве Смоленской области по результатам выборочных копроскопических исследований экстенсинвазированность эймериями поросят опытных групп 0-1-месячного возраста составила 30%, 1-4 месячного возраста – 55%. Интенсинвазированность эймериями поросят подопытных групп составила в среднем 4,16±0,94 ооцист в камере Горяева или 4621,76 ооцист в 1 г кала. У 7-ми поросят опытных и 3-х поросят контрольных групп наблюдали диарею, угнетенное состояние.

Через 10 дней после применения препарата в опытных группах наличие эймерий отмечено у 10% поросят 0-1-месячного возраста, у 14% поросят 1-4 месячного возраста. Через 20 и 30 дней после назна-

чения препарата в опытных группах наличие ооцист эймерий не отмечено, диарея прекратилась, общее состояние улучшилось (табл. 1).

Таблица 1. Эффективность препарата Кокцидин 3Д суспензия при кокцидиозе свиней в условиях хозяйства Смоленской области

Группа	Возр. гр., мес.	Кол-во, гол	ЭИ, % до опыта	ЭИ, % через			ЭЭ,%
				10 сут.	20 сут.	30 сут.	
Опыт 1	0-1	50	30	10	0	0	100
Опыт 2	1-4	50	55	14	0	0	100
Контроль 1	0-1	10	40	50	50	50	0
Контроль2	1-4	10	60	60	60	60	0

У животных контрольных групп наличие ооцист эймерий отмечено у 50 - 60%, а также у 2-х поросят отмечали поносы и угнетенное состояние.

В хозяйстве Нижегородской области интенсинвазированность эймериями поросят опытных групп составила в среднем 2,55±0,54 ооцист в камере Горяева или 2833,05 ооцист в 1 г кала. У2-х поросят первой опытной группы, 2-х поросят второй группы,1-го поросенка третьей группы и 2-х поросят четвертой группы отмечена диарея, угнетенное состояние.

Через 10 дней после назначения препаратов в первой опытной группе наличие эймерий отмечено у 3-х поросят 0-2-месячного возраста, во второй опытной группе - у 6 поросят 2-4-месячного возраста. В третьей опытной группе наличие эймерий отмечено у 2-х поросят 0-2-месячного возраста и в четвертой у 9 поросят 2-4-месячного возраста. В контрольной группе у всех животных отмечено наличие ооцист эймерий. У 2 поросят первой и второй опытных групп и у 3 поросят третьей и четвертой групп также отмечены незначительные поносы.

Через 20 и 30 дней после назначения препаратов в опытных группах наличие ооцист эймерий не обнаружено (табл. 2).

Таблица 2. Эффективность препаратов Кокцидин 3Д суспензия и Байкокс 5% суспензия при кокцидиозе свиней в условиях хозяйства Нижегородской области

Группа	Возр. гр., мес.	Кол-во, гол	ЭИ, % до опыта	Препарат, доза	ЭЭ, % через		
					10 сут.	20 сут.	30 сут.
Опыт 1	0-2	20	100	Кокцидин, 0,4 мл/1 кг	85	100	100
Опыт 2	2-4	20	100	Кокцидин, 0,4 мл/1 кг	70	100	100
Опыт 3	0-2	20	100	Байкокс, 0,4 мл/1 кг	90	100	100
Опыт 4	2-4	20	100	Байкокс, 0,4 мл/1 кг	55	100	100
Контроль	0-4	20	100	-	0	0	0

Следует отметить, что поносы поросят первой и второй групп прекратились на 12-14 сутки эксперимента, общее состояние улучшилось. У 3-х поросят третьей и четвертой групп, несмотря на отсутствие ооцист эймерий, поносы продолжались, и на 15 сутки им были назначены антибактериальные препараты. В контрольной группе наличие ооцист эймерий отмечены у всех животных. На 31 сутки эксперимента поросята контрольной группы были пролечены опытным препаратом Кокцидин 3Д суспензия.

Заключение. Проведенные нами исследования доказали высокую эффективность комплексного препарата на основе толтразурила, сульфадиметоксина и триметоприма при кокцидиозе свиней. При применении препарата не отмечено каких-либо побочных явлений и осложнений.

Литература

1. Вершинин И.И. Кокцидиозы животных и их дифференциальная диагностика/ И.И. Вершинин // Екатеринбург, 1996. – 264 с.

2. Поселов Д.С.Токсикологическая и терапевтическая оценка препарата "Кокцидон суспензия 5 %" при кокцидиозе свиней. / Д.С.Поселов, М.В.Арисов // Российский паразитологический журнал. – 2014. –№ 2. – С. 92-97.

3. Сафиуллин Р.Т.К диагностике кокцидиозов свиней / Р.Т.Сафиуллин //Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2015. – № 16. – С. 386-389.
4. Сафиуллин Р.Т.Экономическая эффективность мероприятий при кокцидиозах свиней / Р.Т.Сафиуллин, А.А.Худяков //Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2016. – №17. – С. 413-417.
5. Худяков А.А. Методические положения по борьбе с кокцидиозами свиней в хозяйствах промышленного типа / А.А. Худяков, Р.Т. Сафиуллин // Российский паразитологический журнал. – 2015. – № 3. – С. 106-109.
6. Яблонский С.А. Кокцидиоз: больные свиньи – плохой доход / С.А.Яблонский // Свиноводство. – 2010. – №6. – С. 60-61.

УДК 006.015.5:619:579.62

ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ ИММУНОДИФФУЗИИ ПО ПАРАМЕТРУ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ АНАЛИЗА

Безгин В.М., доктор биологических наук, профессор, директор

Быкова Н.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, начальник иммунодиагностической лаборатории НПЦ

Юдин В.И., начальник отдела вирусологии НПЦ,

Никитаева Н.Н., биохимик НПЦ,

Алтухова А.А., кандидат биологических наук, биохимик,

Козлов В.Е., доктор биологических наук, профессор,

заместитель директора по науке

Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика – фирма «БИОК», 305004, РФ, г. Курск, Разина, 5,

Тел. +7 (4712) 70-06-70, e-mail: biok@biok.ru

Косарева Т.В., научный сотрудник, ООО «Научно-производственная фирма ИММУНОБИОТЕХ», 305044, РФ,

г. Курск, ул. Соловьиная, 43, Тел. +7 (4712) 34-03-17, e-mail: immunobiotech@yandex.ru

Аннотация. С целью контроля чувствительности набора для диагностики бруцеллёза животных в реакции иммунодиффузии предлагается использовать стандартную слабоположительную бруцеллёзную сыворотку. При исследовании сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота, а также северных оленей показано, что результаты, полученные в тест-системах РИД с высоким уровнем

чувствительности, наиболее полно подтверждаются методами РСК и ИФА. Использование стандартной слабоположительной бруцеллёзной сыворотки позволит осуществлять валидацию параметра чувствительности диагностических наборов РИД. Ключевые слова: бруцеллёз, диагностика, реакция иммунодиффузии.

KIT VALIDATION FOR THE ANIMAL'S BRUCELLOSIS DIAGNOSIS IN THE AGAR GEL IMMUNODIFFUSION BY THE SENSITIVITY PARAMETER OF THE ANALYSIS

Bezgin V.M., D., Bykova N.N., Yudin V.I., Nikitaeva N.N., Altukhova A.A., Kozlov V.Y.

Federal State Enterprise «Kursk Biological Factory – «BIOK», 305004, Russia, Kursk, Razina st., 5, Tel. +7 (4712) 70-06-70, E-mail: biok@biok.ru

Kosareva T. V.

Limited Liability Company «Scientific-Production Firm IMMUNOBIOTEKH», 305044, Russia, Kursk, Solovjinaja st., 43, Tel.+7 (4712) 34-03-17, E-mail: immunobiotech@yandex.ru

Annotation. In order to control the kit sensitivity for the animal's brucellosis diagnosis in the agar gel immunodiffusion (AGID), we offer to use a weak positive standard brucellosis serum. Studying of cattle and small cattle blood serum, as well as reindeer, has shown that the results of the AGID test-systems with a high level of sensitivity are fully confirmed by the CFT and ELISA methods. The standard weak positive brucellosis serum usage will allow to validate the sensitivity parameter of AGID diagnostic kits.

Key words: brucellosis, diagnosis, agar gel immunodiffusion.

Введение. Бруцеллёз – хронически протекающая инфекционная болезнь всех млекопитающих, в том числе и человека, вызываемая бактериями рода Brucella, объединяющего следующие виды: B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. neotomae, B. ovis, B. canis, B. ceti, B.

pinnipedialis, B. microti, B. inopinata и входящего в семейство Brucellaceae, подкласс Rhizobiales, класс Альфа-Протеобактерии, подцарство Протеобактерии, царство Бактерии. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) бруцеллёз включён в категорию «Болезни, поражающие несколько видов» [1], согласно приказу Минсельхоза РФ от 19 декабря 2011 г. № 476 бруцеллёз входит в «Перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин)».

В Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных МЭБ [1] описаны серологические тесты для выявления бруцеллёзных животных: тесты с забуференным антигеном *Brucella*, иммуноферментный анализ (ИФА), метод флуоресцентной поляризации и реакция связывания комплемента (РСК). При этом указывается, что из-за ложноположительных реакций, которые обусловлены сходством строения гладкого липополисахаридного антигена у грамотрицательных бактерий, в основном *Yersinia enterocolitica* и бруцелл, ни один из этих тестов не обладает оптимальной чувствительностью и специфичностью.

В РФ лабораторная диагностика бруцеллёза животных проводится в соответствии с Наставлением по диагностике бруцеллёза животных [2] и ГОСТом 34105-2017 [3], которые устанавливают методы серологической диагностики бруцеллёза, включающие в том числе реакцию иммунодиффузии (РИД) в геле агара с олигополисахаридным (ОПС) антигеном.

Основным условием получения достоверных результатов анализа является стандартизация антигенных и антительных биопрепаратов, используемых в иммунодиагностических тестах [4].

С целью исключения влияния разброса качественных показателей различных серий диагностикумов на результаты исследований

предусмотрен обязательный контроль тест-систем с применением международных стандартов [5]. В нормативах МЭБ даны указания о необходимости подготовки на основе международных стандартов образцов национальных стандартов и вторичных (рабочих) стандартов, которые могут быть использованы в практической лабораторной деятельности.

ФКП «Курская биофабрика» изготавливает ИФА-диагностикумы бруцеллёза с 2008 г. В 2013 – 2014 гг. специалисты предприятия совместно с ООО «НПФ ИММУНОБИОТЕХ» провели исследования по разработке набора для диагностики бруцеллёза животных в РИД с использованием диагностического ОПС антигена, предложенного Bundle D.R. с соавт. [6].

Высокая специфичность РИД сопровождается низкой чувствительностью реакции, что может приводить к значительному количеству ложноотрицательных результатов, поэтому для данного метода анализа крайне важно осуществлять контроль параметра чувствительности тест-системы.

Цель исследования – валидация параметра чувствительности тест-системы для диагностики бруцеллёза животных в РИД.

Материалы и методы. В работе использовали «Набор для диагностики бруцеллёза животных в реакции иммунодиффузии» (ФКП «Курская биофабрика»), «Набор для диагностики бруцеллёза животных иммуноферментным методом» (ФКП «Курская биофабрика»), «Тест-систему для диагностики бруцеллёза животных в РА, РСК и РДСК» (ФКП «Щелковский биокомбинат»), национальную стандартную сыворотку anti-Brucella abortus (ФГБУ «ВГНКИ»), сыворотки крови больных бруцеллёзом и здоровых животных, полученных из Краснодарского края, Ямало-Ненецкого автономного округа, Республики Саха (Якутия), Волгоградской и Курской областей. Работу с

наборами проводили в соответствии с Инструкциями по применению.

Результаты и обсуждение. Схема валидации метода должна включать использование сывороточных стандартов с известным статусом. Для дополнительного контроля активности ОПС антигена использовали сильно-положительный стандарт: национальную стандартную сыворотку anti-Brucella abortus, (ФГБУ «ВГНКИ»), активность которой устанавливается по отношению к международной стандартной сыворотке МЭБ – OIEISS anti-Brucella abortus. ОПС антиген во всех сериях «Набора для диагностики бруцеллёза животных в реакции иммунодиффузии» образовывал чёткую полосу преципитации в РИД с национальной стандартной сывороткой anti-Brucella abortus в разведении 1:2 – 1:4. Поэтому в нормативный документ ФКП «Курская биофабрика» СТО 00482909-120-2015 внесено требование к активности ОПС антигена: должен давать в РИД чёткую линию преципитации с национальной стандартной сывороткой anti-Brucella abortus в разведении не менее 1:2.

Для РИД, которая обладая высокой специфичностью, характеризуется низкой чувствительностью и возможностью проявления ложноотрицательных результатов, требуется контроль тест-систем слабоположительной сывороткой. С целью стандартизации РИД по параметру чувствительности изготовлены и апробированы контрольные слабоположительные бруцеллёзные преципитирующие сыворотки с титром в РСК 1:20, 1:40 и 1:80. Сыворотка с титром в РСК 1:20 в реакции иммунодиффузии не проявляла видимой преципитации. Сыворотка с титром в РСК 1:40 выявлялась как положительная с наборами, в которых ОПС антиген имел более высокую концентрацию. Сыворотка с титром в РСК 1:80 образовывала с ОПС антигеном чёткую линию преципитации во всех опытах.

На следующем этапе провели исследование сывороток крови животных в РИД, РСК и ИФА.

При анализе сывороток крови мелкого рогатого скота, полученных из Волгоградской области, установлено, что положительно в РИД реагировали 5 проб, в РСК – 8, в ИФА – 12, при этом три положительные пробы с титром антител в РСК 1:20, не выявлялись в РИД. Все пробы с титром в РСК 1:40 и выше – определялись в РИД как положительные.

7 сывороток крови крупного рогатого скота, доставленных из хозяйств Краснодарского края, дали положительные реакции во всех использованных методах – РИД, РСК и ИФА.

Из 20 сывороток крови крупного рогатого скота, полученных из хозяйств Курской области, ни в РИД, ни в РСК, ни в ИФА не выявлено положительно реагирующих образцов.

Из 39 сывороток крови, доставленных из хозяйств Республики Саха, Якутия, в 19 сыворотках обнаружены специфические антитела к антигенам бруцелл в РИД, РСК и ИФА, при этом титр положительных сывороток в РСК был выше, чем 1:40.

При исследовании 20 сывороток крови северных оленей, доставленных из Ямало-Ненецкого автономного округа, получены отрицательные реакции в РИД, РСК и ИФА.

Результаты, полученные в РИД, подтверждаются методами РСК и ИФА. Титр антител положительных сывороток, не выявляемых в РИД, составлял в РСК 1:20 и ниже, образцы сывороток с титром в РСК 1:40 и выше были положительны в РИД. Таким образом, использование стандартной слабоположительной бруцеллёзной сыворотки с титром в РСК 1:40 позволяет проводить валидированный по чувствительности анализ образцов сывороток разных видов животных.

На предприятии была изготовлена лиофилизированная контрольная слабоположительная бруцеллёзная преципитирующая сыворотка как вариант рабочего стандарта. С применением данной сыворотки в настоящее время проводится контроль «Набора для диагностики бруцеллёза животных в реакции иммунодиффузии». Коммерческие диагностические наборы обладают достаточной чувствительностью и обеспечивают результаты РИД, которые коррелируют с результатами РСК и ИФА.

Литература

1. Brucellosis // OIE. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.4 Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis) (Infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis) – 2016. – 44 p. – URL:http://www.oie.int/ fileadmin/ Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf.

2. Наставление по диагностике бруцеллёза животных. Утверждено Руководителем Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 29.09. 2003 г. № 13-5-02/0850. – М., 2003. – 64 с.

3. ГОСТ 34105-2017. Межгосударственный стандарт. Животные. Лабораторная диагностика бруцеллёза. Серологические методы. – Взамен ГОСТ 25385-91 в части серологических методов диагностики. Введен 01.07.2018. – М.: Стандартинформ, 2017. – 27 с.

4. Validation // OIE. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 1.1.6 Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases – 16 p. – URL:http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_ VALIDATION.pdf.

5. International Reference Antibody Standards for Antibody Assays // OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases – 5 p. – URL:http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_ expertise/docs/pdf/ GUIDELINE_3_REF_STANDARDS_ANG.pdf.

6. Patent US 5006463 A «Immunoassays for discriminating between brucellosis infections and vaccinations» (Патент США 5006463 «Иммуноанализы для дифференциации между бруцеллезными инфекциями и вакцинациями») / Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Duncan J. R., Nielsen K., Perry M.B., Wright P.F.; приоритет от 26.09.1986, опубликован 09.04.1991.

УДК 619:616.981:42

БОЛЕЗНИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И БОРЬБА С НИМИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Белименко В.В., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории протозоологии

Самойловская Н.А., кандидат биологических наук, заместитель директора ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН по инновационной деятельности, Эксперт РАН.

Исаев Ю.Г., кандидат биологических наук, Учёный секретарь

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук

Аннотация. Иксодовые клещи относятся к раздельнополым хелицеровым членистоногим животным (тип Arthropoda) с непостоянной температурой тела, являясь представителями класса паукообразных (Arachnoidea), отряда паразитиформных (Parasitiformes), семейства Ixodidae. Клещи всех видов питаются кровью и паразитируют преимущественно на млекопитающих и на птицах, иногда на рептилиях. Многие охотно нападают и на человека. Освещены вопросы биологической опасности и социальной значимости иксодовых клещей и клещевых болезней на территории Российской Федерации, современной эпидемиологической и эпизоотологической ситуации, применения геоинформационных систем, атласного картографирования и математического моделирования в системе монито-

ринга этих болезней, а также методы борьбы с клещами и профилактики клещевых инфекций и инвазий, особенно на охраняемых природных территориях

Ключевые слова: иксодовые клещи, риск-ориентированный мониторинг, геоинформационные системы.

Abstract. Ixodid ticks are arthropod (type Arthropoda) with non-constant body temperature, being representatives of the arachnid class (Arachnoidea), parasitiformes order (Parasitiformes), family Ixodidae. Ticks of all kinds feed on blood and parasitize mainly on mammals and on birds, sometimes on reptiles. Also, they attack people. The issues of biological danger and social significance of ixodic ticks and tick-borne diseases on the territory of the Russian Federation, the current epidemiological and epizootological situation, the use of geographic information systems, satin mapping and mathematical modeling in the system for monitoring these diseases, as well as methods for tick-borne infections and invasions are covered. especially in protected natural areas

Key words: hard ticks, risk-based monitoring, GIS.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг., тема (проект) №.0578-2015-0002 «Анализ и оценка рисков распространения трансмиссивных клещевых болезней (пироплазмидозы, анаплазмозы, болезнь Лайма) на территории Европейской части Российской Федерации».

Финансирование работы было получено в рамках Государственного задания из федерального бюджета без привлечения дополнительных источников финансирования.

Иксодовые клещи относятся к раздельнополым хелицеровым членистоногим животным (тип Arthropoda) с непостоянной температурой тела, являясь представителями класса паукообразных

(Arachnoidea), отряда паразитиформных (Parasitiformes), семейства Ixodidae.

Клещи всех видов питаются кровью и паразитируют преимущественно на млекопитающих и на птицах, иногда на рептилиях. Многие охотно нападают и на человека.

Тело клещей слитое, не сегментировано на отделы, форма овально-удлиненная. В передней части тела находится ротовой аппарат – хоботок. При помощи хоботка клещи фиксируются на теле хозяина и питаются его кровью или лимфой. К нижней стороне тела прикрепляются четыре пары членистых ног. Они подвижно соединены с туловищем. На верхней стороне туловища имеется спинной щиток, состоящий из твердого хитина. Остальной хитиновый покров мягкий и способен растягиваться при насасывании крови. У самцов спинной щиток покрывает почти всю спинную поверхность туловища, а у самок – только переднюю треть его. Именно поэтому при питании кровью тело самцов почти не увеличивается, а тело самок увеличивается в десятки и сотни раз и достигает размеров 20-30 мм. По цвету щитка, форме хоботка, наличию глаз и другим признакам определяют вид клещей.

В отдельных регионах соотношение различных родов и видов клещей сильно варьирует. В средней и южной полосах наиболее многочисленным является род Dermacentor, в восточной же части наблюдается преобладание клещей рода Ixodes.

Места обитания клещей называют биотопами. В биотопах клещи ведут скрытый наземный образ жизни (в траве, прикорневой части растений, различных складках местности). Весной голодные имаго (взрослые особи) начинают активно отыскивать прокормителей. В это время они очень подвижны, взбираются на стебли травы, на кустарники и даже на деревья.

Клещи чувствительны к запахам, температуре, концентрации углекислого газа в атмосфере и колебанию почвы. При приближении прокормителя (животное или человек) клещи переползают на него, прокалывают хоботком кожу, фиксируются на ней и начинают сосать кровь. Самки во время сосания крови оплодотворяются самцами, а, напитавшись, отпадают на землю и откладывают яйца. После этого самцы погибают.

Иксодовые клещи в процессе развития проходят ряд последовательных стадий: яйцо, личинка, нимфа, имаго.

Яйцекладка начинается через 2-10 дней после отделения самки от тела хозяина, происходит порциями и длится до 4 недель. Всего самка откладывает от 3 до 15 тысяч яиц, после чего погибает.

Из яиц выходят шестиногие личинки, которые должны питаться лимфой млекопитающих в течение 2-4 дней. Часто они паразитируют на грызунах и насекомоядных, но могут питаться и на других животных. Сытые личинки линяют и превращаются в нимф. Этот процесс происходит, в зависимости от вида клеща, на теле хозяина или на земле.

Нимфы крупнее личинок и имеют восемь ног. Они также питаются кровью животных в течение 4-6 дней, после чего линяют и превращаются в имаго (тоже на теле хозяина или на земле).

Весь цикл развития клещей, в зависимости от географической зональности, длится от 3-4 месяцев до 3-4 лет (в северных широтах). В средней полосе РФ все стадии развития клещей от яйца до имаго проходят за один весенне-летне-осенний сезон, а в целом за год развивается одно поколение клещей, так как осенью самки не откладывают яиц. Они их отложат после зимовки, следующей весной. Регистрируются две волны паразитирования клещей: весенняя (апрель-июнь) и осенняя (август-октябрь).

В пределах одного участка местности высокая заклещеванность отмечается не повсеместно, а «мозаично», то есть очагово. Это связано с тем, что для жизнедеятельности клещей необходимы достаточная влажность среды и наличие животных-прокормителей (в том числе мелких грызунов, на которых питаются личиночные стадии). Там, где совсем нет животных, нет и клещей.

Иксодиды фауны России относятся к шести родам: Ixodes Latreille, 1795. (прицепыш), Dermacentor Koch, 1844. (кожерез), Rhipicephalus Koch, 1844. (веероголов), Haemaphysalis Koch, 1844. (кровосос), Hyalomma Koch, 1844. (стеклоглаз), Boophilus Curtice, 1891. (быколюб). Каждый род включает несколько видов.

12 сентября 2018 года в Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина прошел Круглый стол, посвященный проблемам клещевых болезней животных и человека на территории Российской Федерации, организованный совместно ФГБНУ Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук, Московской государственной академией ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, Российским научно-практическое обществом ветеринарной иммунологии и иммунопатологии, НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных и Инновационным ветеринарным центром Московской ветеринарной академии.

Президиум:

- Гулюкин Михаил Иванович – академик РАН, научный руководитель ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

- Верховский Олег Анатольевич – доктор биологических наук, профессор, президент НИИ ДПБ, почетный президент РОВИ.

- Симонова Елена Геннадиевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры эпидемиологии института профессионального образования Первого МГМУ имени И.М. Сеченова

Модераторы:

1. Верховский Олег Анатольевич – президент НИИ ДПБ, доктор биологических наук, профессор, почетный президент Российского научно-практического общества ветеринарной иммунологии и иммунопатологии (РОВИ).

2. Фомин Андрей Вадимович – президент Российского научно-практического общества ветеринарной иммунологии и иммунопатологии (РОВИ), сопредседатель Движения зоовладельцев России (ДОЗОР), председатель подкомитета по биологической безопасности Торгово-промышленной палаты Нижегородской области.

3. Белименко Владислав Валерьевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории протозоологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Эксперт Фонда развития Центра разработки и коммерциализации новых технологий (фонд Сколково).

Партнёры Круглого стола:

• ЗАО «Микро-Плюс»

• ООО «Био среда»

Информационные партнеры:

• Российский ветеринарный журнал (Логос-Пресс)

• Журнал «Ветеринария и кормление»

• Журнал «Санитарный врач»

• Журнал «Ветеринария»

На заседании были освещены вопросы биологической опасности и социальной значимости иксодовых клещей и клещевых болезней на территории Российской Федерации, современной эпидемиологической и эпизоотологической ситуации, применения геоинформационных систем, атласного картографирования и мате-

матического моделирования в системе мониторинга этих болезней, а также методы борьбы с клещами и профилактики клещевых инфекций и инвазий, особенно на охраняемых природных территориях.

Участниками Круглого стола отмечено, что:

- В настоящее время система государственного эпидемиологического мониторинга осуществляет надзор за следующими клещевыми инфекциями: клещевой энцефалит (КЭ), иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ), крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), риккетсиозы (сибирский клещевой тиф, астраханская пятнистая лихорадка, марсельская (средиземноморская) лихорадка), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ), гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ), омская геморрагическая лихорадка (ОГЛ), туляремия, лихорадка Ку (коксиеллез), в то время как государственная ветеринарная служба проводит эпизоотологический мониторинг за пироплазмидозами (бабезиозы и тейлериоз крупного рогатого скота, бабезиоз и нутталлиоз лошадей, бабезиоз собак) и анаплазмозом крупного рогатого скота. Мониторинг за передающимися клещами болезнями, общими для животных и человека (клещевые боррелиозы, гранулоцитарный анаплазмоз, эрлихиоз) государственной ветеринарной службой не осуществляется.

- Отсутствует единая межведомственная системы мониторинга клещевых заболеваний. Каждое ведомство проводит свой мониторинг, информация для которого собирается от подведомственных организаций без учёта сведений, полученных другими органами исполнительной власти и научными организациями. Иными словами, отсутствует единая картина эпидемиологической и эпизоотологической ситуации в Российской Федерации.

- В систему государственного мониторинга клещевых болезней животных и человека следует широко внедрять геоинформаци-

онный метод как универсальный инструмент оценки, анализа и управления рисками.

-К настоящему времени разработан широкий арсенал средств и методов диагностики, терапии и профилактики клещевых болезней, а также эффективных средств борьбы с иксодовыми клещами.

- Население довольно слабо информировано о большинстве болезней, передающихся клещами. Также среди населения бытует множество мифов и некорректной информации.

Программа круглого стола

Название доклада	Спикер
Вклад отечественных учёных в изучение клещей и кровепаразитарных болезней животных	**Гулюкин Михаил Иванович –** научный руководитель ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, академик РАН, доктор ветеринарных наук, профессор
Эпизоотологические данные о клещевых инфекциях на территории России. Задачи, стоящие перед государственными органами в деле борьбы и профилактики заболеваний	**Вергунов Олег Петрович** –и.о. начальника отдела противоэпизоотических и лечебно-профилактических мероприятий Комитета ветеринарии г. Москвы.
Эпидемиологический надзор за инфекциями, передающимися клещами на территории Российской Федерации	**Симонова Елена Геннадиевна –** доктор медицинских наук, профессор кафедры эпидемиологии института профессионального образования Первого МГМУ имени И.М. Сеченова
Обоснование назначения Гамавита при кровопаразитарных заболеваниях	**Расстригин Алексей Евгеньевич –** кандидат биологических наук, представитель ЗАО «Микро-Плюс». Доклад официального партнёра мероприятия
Иксодовые клещи. Характеристика, биология, эпизоотологическое и эпидемиологическое значение	**Белименко Владислав Валерьевич -** кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории протозоологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН **Исаев Юрий Геннадиевич –**кандидат биологических наук, Ученый секретарь ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
Иксодофауна и методы борьбы с клещами на охраняемых природных территориях	**Самойловская Нина Александровна –** кандидат биологических наук, заместитель директора ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН по инновационной деятельности, Эксперт РАН.
Геоинформационные системы и их применение в борьбе с трансмиссивными заболеваниями животных и человека	**Конон Николай Иванович** – доктор технических наук, Действительный член Академии космонавтики, дважды лауреат Премии правительства РФ в области науки и техники.
Атласное картографирование природноочаговых болезней в России	**Миронова Варвара Андреевна –**кандидат географических наук, старший научный сотрудник кафедры биогеографии географического факультета МГУ.
Математическое моделирование распространения эпидемий и эпизоотий клещевых инфекций и инвазий	**Шабейкин Александр Александрович** – кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией эпизоотологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
Совершенствование методов отбора проб крови от животных	**Конон Николай Иванович** – доктор технических наук, Действительный член Академии космонавтики, дважды лауреат Премии правительства РФ в области науки и техники.
Бабезиоз собак	**Давыдова Ольга Евгеньевна –** кандидат биологических наук, доцент кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы МГАВМиБ
Современные методы терапии бабезиоза собак	**Саруханян Артур Рубикович –** руководитель ветеринарной выездной службы, практикующий ветеринарный врач
Современные методы борьбы с иксодовыми клещами	**Арисов Михаил Владимирович –** доктор ветеринарных наук, директор ФГБНУ ВНИИП – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
Субъективная оценка рисков клещевых инфекций населением. Риск-ориентированный мониторинг клещевых заболеваний животных.	**Белименко Владислав Валерьевич** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории протозоологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

УДК 619:612.1:636.2.034:615.918

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АЛИМЕНТАРНОГО КЕТОЗА У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ

Белоусов А.И., кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник

Красноперов А.С., кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник

Опарина О.Ю., научный сотрудник

Суздальцева М. А., научный сотрудник

ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», индекс 620142, г. Екатеринбург, Россия, Тел. (343) 257-20-44, факс (343) 257-82-63

Аннотация. Успешность развития молочного животноводства складывается из многих факторов, главным из которых является соблюдение технологии кормления. Несоответствие параметров качества основных кормов является ведущим этиологическим фактором в развитии обменных нарушений у высокопродуктивных коров.

Настоящая работа посвящена изучению проблемы возникновения алиментарного кетоза у коров, для выявления специфических метаболических маркеров при развитии патологического процесса. Развитие алиментарного кетоза сопровождается возникновением целого ряда патобиохимических реакций, к наиболее важными из которых следует относить: синдром трофической недостаточности, интоксикационный синдром и местную воспалительную реакцию.

Ключевые слова: высокопродуктивные коровы, недоброкачественное кормление, метаболический профиль, клиническая биохимия, алиментарный кетоз, кетонемия.

METABOLIC SIGNS OF NUTRITIONAL KETOSIS IN HIGHLY PRODUCTIVE COWS

Belousov A.I., Krasnoperov A.S., Oparina O.Yu., Suzdaltseva M. A.
Federal state budgetary scientific institution «Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Science», 620142, Ekaterinburg, Russia, Tel. (343) 257-20-44, Fax (343) 257-82-63

Summary. The theme of this work is devoted to the study of alimentary ketosis. The agricultural enterprise was studied, which registered inconsistencies in the quality of feeding. The analyzed samples were nonstandard. It was established that the content of butyric acid exceeded 2.6 and 6.1 times, where the percentage of lactic acid to the total number of acids was 61.4% and 9.0%, appropriately. Clinical examination of cows confirmed the diagnosis of alimentary ketosis.The main clinical sings of ketosis were decreased appetite and refusal to feed, reduced milk production, hypotension and atony of the rumen, the smell of acetone from the mouth, clinical signs of dehydration. Metabolic disorders, due to which there is an accumulation of ketone bodies in the blood, are the main diseases in the structure of highly productive cows. The effectiveness of ketosis treatment depends on the time of diagnosis and start of treatment. The development of alimentary ketosis is accompanied by the appearance of the spectrum of pathobiochemical reactions. The development of trophic insufficiency syndrome, intoxication syndrome and local inflammatory reaction are marked. Specific metabolic signs of alimentary ketosis were established. Marked signs of nutritional failure - hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and hypocalcemia, hypophosphatemia.

Signs of an inflammatory reaction are a tendency to increase the total number of white blood cells, as well as a shift in the leukocyte formula to the right, the accumulation of segmented neutrophils. The impor-

tant features of the pathological process include a decrease in the absolute number of lymphocytes by 10.8%, primarily due to the loss of t-cell immunity. in cows with signs of ketonemia, the average content of bicarbonates was 21.3±5.1 mmol/l, which is 13.3% lower than the same group. Maximum deviations of bicarbonate anion concentrations did not fall below 17.0-18.0 mmol/l. Ketones are the etiological factors in the development of hepatopathology in cattle. Thus, in clinically ill cows the tendency to accumulation of transaminases (aspartate aminotransferase), lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase in blood was established. Thus, the activity of AST and LDH in cows with signs of ketonemia averaged 91.3±23.6 U/l and 1193.11±187.9 U/l, which is 13.91% and 12.81% higher than the average of healthy cows.

Metabolic changes are characterized by violation of most types of metabolism, with a relatively poor change in the parameters of the acid-base state, and a disturbance of the function of the hepatobiliary system.

Key words: highly productive cows, substandard feeding, metabolic profile, clinical biochemistry, alimentary ketosis, ketonemia.

ВВЕДЕНИЕ. Строгое соблюдение технологических аспектов является необходимым условием максимальной реализации генетического потенциала и поддержания продуктивного здоровья высокопродуктивных коров[6].Нередко именно параметры качества применяемых кормов являются главной причиной развития алиментарных заболеваний и отравлений. Проявление интоксикационного синдрома имеет свои особенности в зависимости от факторов риска: наличие микотоксинов, патогенной и условно-патогенной микрофлоры, нарушение соотношения органических кислот, наличие в кормах кетонов, лактата и др. Этиологический фактор вырабатывает патогномоничные адаптационно-приспособительные механизмы организма и формирует свою уникальную клиническую картину. Изменениям подвержен метаболический профиль и иммунологический

статус животных, что в свою очередь может быть использовано в клинической биохимии для выявления точных метаболических маркеров. Работа посвящена изучению клинических проявлений алиментарногокетоза у высокопродуктивных коров. Дано научное обоснование метаболические изменений при алиментарном кетозе в сравнительном аспекте с группой условно здоровых животных.

В структуре заболеваний незаразной этиологии высокопродуктивных коров особое место занимают метаболические нарушения, вследствие которых происходит накопление в крови кетоновых тел. Кетоз является полиэтиологичным заболеванием, эффективность лечения которого напрямую зависит от времени постановки диагноза и начала лечения. Мониторинговые лабораторные исследования кормов, проведенные сотрудниками Уральского науноисследовательского ветеринарного института (Уральского НИВИ, Екатеринбург) указывают на высокий процент применения в сельскохозяйственных предприятиях региона кормов, не удовлетворяющих основным параметрам качества [2].

В этой связи, важным представляется изучение вопросов диагностики алиментарного кетоза, который развивается при скармливании недоброкачественного силоса или сенажа с высоким содержанием масляной кислоты при непосредственном поступлении масляной кислоты из корма в кровь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Исследования выполнены в ФГБНУ УрФАНИЦУрО РАН в рамках Государственного задания ФАНО России по направлению 160 Программы ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг. по теме: «Разработать научно обоснованную систему диагностики, профилактики и лечения незаразных болезней сельскохозяйственных животных и получения биологически полноценной безопасной продукции животноводства» (№ 0773-2018-0003).

Для лабораторного скрининга использовали биологический материал, полученный от высокопродуктивных коров. Всего исследовано 68 проб плазмы крови и 68 проб цельной крови, в качестве антикоагулянтов применяли гепарин лития и этилендиаминтетрааце-тат соответственно.

Биохимический анализ плазмы крови выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Chem Well-2910 Combi фирмы Awaveness Technology (USA) с использованием стандартных наборов реактивов фирм Vital Diagnostics Spb (Россия), DIALAB GmbH (Австрия). Достоверность выполнения измерений подтверждена контрольными материалами, рекомендованными производителями реактивов.

Гематологические показатели определяли на полуавтоматическом анализаторе Abacus Junior Vet (Австрия), с использованием стандартных наборов реактивов фирмы Diatron (Венгрия). Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза по общепринятой методике, на бинокулярном микроскопе Micros MCX 100 (Австрия).

В ходе клинического осмотра маточного поголовья также проведены исследования проб мочи, для проведения биохимического исследования с использованием визуальных тест полосок (метод сухой химии) NONAPHAN. Всего исследовано 30 проб мочи.

Массовую долю органических кислот определяли согласно ГОСТ Р 55986-2014 «Силос из кормовых растений. Общие технические условия», в соответствие с пунктом 8.15

Определение общей токсичности проводили в соответствие с методикой ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности», п.5.2. Установление наличия плесневых грибов в исследуемых кормах проводили в соответствие с ГОСТ 10444.12-2013 «Микробиология пищевых про-

дуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов».

Исследования проведены на базе сельскохозяйственного предприятия при лабораторных исследованиях сочных кормов которого были установлены признаки нарушения соотношения органических кислот, превышение содержания масляной кислоты.

Статистические расчеты проводили с применением пакета анализа Statistica 10.0. Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий - U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. На первом этапе исследований проводили изучение показателей качества кормов, являющихся основой рациона: силос клеверный, силос разнотравный, силос костерно-люцерновый. Химический анализ кормов показал, что два анализируемых образца не отвечают требованиям регламентированным нормативными документами. Установлено превышение содержания масляной кислоты в 2,6 и 6,1 раза, при этом процентное соотношение молочной кислоты к общему количеству кислот составляло 61,4% и 9,0% соответственно. (Табл. 1) Низкое качество анализируемых проб подтверждает смещение pH в щелочную сторону –5,45 и 7,16 ед.

Таблица 1. Результаты химико-физического анализа кормов

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Наименование НД на метод испытаний	силос (образец № 3-клевер	силос (образец № 2)	силос (образец № 1, люцерна+костер
1	pH, ед.		3,8-4,5	4,23	7,16	5,45
2	Массовая доля органических кислот: -уксусная - масляная - молочная Молочная (от общего количества кислот)	%	ГОСТ Р 55986-2014 Силос из кормовых растений. Согласно п.8.15	 0,30 0,79 1,73 61,35	 0,89 1,84 0,27 9,0	 0,71 Не обнаружено 2,79 51,24

При клиническом обследовании коровбыл установлен диагноз «алиментарный кетоз». Главными клиническими проявлениями кетоза являлись снижение аппетита и отказ от корма, резкое снижение молочной продуктивности, гипотония и атония преджелудков, запах ацетона изо рта, клинические признаки дегидратации.

Исследование рубцового содержимого на показатели pH не выявило значительных отклонений у большинства животных – в среднем 7,0 ±0,58 у.е, что указывает на тенденцию к повышению общей кислотности в пределах физиологических значений. В ходе исследования проб мочи установлено положительная реакция на содержание кетоновых тел у более чем 70,0% исследованных проб.

Биологический материал для биохимических и иммуногематологических исследований отбирали у коров, условно разделенных на две группы: клинически больные(n=40) и клинически здоровые коровы (n=28).

Главными метаболическими признаками развития алиментарного кетоацидоза является развитие синдрома общей трофической недостаточности, местной воспалительной реакции и развитие общей интоксикации на фоне накопления кетоновых тел.

К регистрируемым метаболическим проявлениям алиментарной недостаточности, относится гипоальбуминемия, гипохолестеринемия и гипокальциемия. Так, содержание общего холестерина и количество альбуминов у коров с клиническими проявлениями алиментарного кетоза были достоверно снижены на 17,12% и 56,90% соответственно. Снижение количества альбуминов свидетельствует о слабом усвоении протеинов в кишечнике и недостаточном синтезе микробиального белка [9].

Сравнительное изучение групп животных показало, что в плазме крови коров с признаками кетонемии содержание общего кальция снижается, что подтверждается статистическими методами. В группе коров больных кетозом, средняя концентрация кальция в среднем на 16,3 % ниже при сравнении с группой здоровых коров. Полученные результаты согласуются с данными других ученых, исследованиями которых доказано, что при преобладании в рационе кислых кормов а также у коров с субклиническим кетозом отмечается снижение его содержания [1].

Аналогичная тенденция установлена прианализа содержания неорганического фосфора плазмы крови – снижение на 7,3% у коров с признаками кетонемии. Снижение неорганического фосфора, по нашему мнению, является следствием гормональной переориентации организма при развитии гипокальциемии. Тенденцию к изменению активности кальций-фосфорного обмена подтверждает повышенная активность щелочной фосфатазы у клинически больных коров. Гормональная регуляция кальций- фосфорного обмена, представляет собой сложное взаимодействие паратгормона, кальцитриола, кальцитонина и инсулина [3]. При этом наиболее важное значение отводится паратгормону. Секреция паратгормона регулируется уровнем ионов кальция в плазме: гормон секретируется в ответ на снижение концентрации кальция в крови. В костной ткани рецепторы паратгормона

локализованы преимущественно на остеобластах и остеоцитах. При связывании паратгормона с рецепторами клеток-мишеней остеобласты начинают усиленно секретировать инсулиноподобный фактор роста 1 и цитокины, которые стимулируют метаболическую активность остеокластов – происходит ускорение синтеза основных ферментов действующих на костный матрикс. При ферментативной активности щелочной фосфатазы и коллагеназы усиливается мобилизация катинов кальция и фосфатов из кости во внеклеточную жидкость. В почках паратгормон стимулирует реабсорбцию кальция в дистальных извитых канальцах и тем самым снижает экскрецию кальция с мочой, и напротив уменьшает реабсорбцию фосфатов [4].

О развитии выраженной воспалительной реакции говорят иммуно - гематологические показатели -тенденция к увеличению общего количества лейкоцитов, а также смещение лейкоцитарной формулы вправо: снижение количества палочкоядерных нейтрофилов и накопление сегментоядерных нейтрофилов. Повышение количества эозинофилов могут указывать на развитие процессов аллергической сенсибилизации [5]. К важным особенностям патологического процесса следует отнести снижение абсолютного количества лимфоцитов на 10,8%, прежде всего за счет потери Т-клеточного звена иммунитета, а также уменьшение числа иммунных клеток, способных к фагоцитозу на 11,1%.

Для клинически больных животных характерно значительное нарушение соотношения белковых фракций, выражающееся в остром снижении альбуминов, на фоне значительного накопления количества глобулинов. Так, у 70,0% клинически больных коров регистрировали гиперглобулинемию, что выражается в значительном изменении средних значений показателей - 56,6±7,5 г/л (увеличение на 30,56%, относительно группы клинически здоровых животных). Полученная картина является прямым отражением развития воспалительной ре-

акции кишечника, при местно раздражающем действии органических кислот на стенку желудочно-кишечного тракта.

Кетоз согласно общим представлениям является разновидностью метаболического ацидоза - кетоацидоз, что может обуславливать влияние на состояние буферных систем организма. Согласно наших исследований, содержание бикарбонатов крови у клинически больных коров не имело достоверных различий при сравнении с группой здоровых животных. Тем не менее, определенное влияние кетонемии на буферную систему крови коров было установлено. Так, у коров с признаками кетонемии, среднее содержание бикарбонатов составило 21,3±5,1 ммоль/л, что на 13,3% ниже аналогичной группы сравнения, а максимальные отклонения концентраций бикарбонатного аниона не опускались ниже 17,0-18,0 ммоль/л. Схожая тенденция была выявлена при изучении количества эритроцитов у обследуемых групп животных. Выявленные сдвиги указывают на развитие у животных компенсированной (хронической) формы кетоза, сопровождающейся истощением буферной емкости крови. При этом отсутствие резких колебаний показателей КОС могут указывать на высокую эффективность в поддержании щелочного резерва дыхательной и выделительной систем.

Наши исследования согласуются с исследованиями других ученых, согласно исследованиям которых, кетонемия у жвачных животных в большинстве случаев не сопровождается развитием ацидемии. [8].

Таблица 2. Биохимические показатели крови коров с признаками алиментарного кетоацидоза в сравнение с группой клинически здоровых животных (n=68).

Показатель	Ед.изм	Клинически здоровые (n=28)				С признаками кетоза (n=40)				Разница между группами, %	Критерий Манна-Уитни, p
		X̄	SD	min	max	X̄	SD	min	max		
Общий Белок	г/л	77,7	6,2	64,1	81,9	84,4	4,6	75,9	92,2	8,56	0,015
Альбумин	г/л	34,4	3,0	30,6	38,7	28,5	4,7	18,5	34,8	-17,12	0,015
Глобулины	г/л	43,3	4,9	33,3	47,4	56,6	7,5	44,5	67,4	30,56	0,006
АсТ	Ед/л	80,2	10,7	61,1	90,8	91,3	23,6	53,5	123,8	13,91	0,435
Глюкоза	ммоль/л	3,9	0,5	2,8	4,5	2,3	0,4	1,2	3,2	-23,7	0,000
Креатинин	мкмоль/л	85,0	20,3	48,9	110,0	90,2	31,9	41,6	155,2	6,06	0,733
Мочевина	ммоль/л	3,3	0,8	1,9	4,3	4,2	1,5	1,7	6,6	26,90	0,233
Общий билирубин	мкмоль/л	5,0	2,8	0,0	8,9	7,6	5,0	1,9	16,0	51,77	0,329
Щелочная фосфатаза	Ед/л	48,4	11,9	32,0	65,0	77,4	41,7	45,0	191,0	59,82	0,019
Бикарбонаты	ммоль/л	24,6	6,0	21,4	30,7	21,3	5,1	17,0	24,7	-13,31	0,290
Гамма-ГТ	Ед/л	6,2	4,4	2,1	11,7	7,4	5,9	1,7	18,8	19,18	0,724
КФК общая	Ед/л	152,3	44,2	100,9	233,9	184,5	124,5	77,2	498,6	21,14	0,884
Калий	ммоль/л	4,5	0,7	3,9	5,8	4,4	0,8	3,4	5,9	-0,50	1,000
Кальций	ммоль/л	2,39	0,12	2,2	2,6	2,15	0,13	2,0	2,3	16,3	0,001
ЛДГ	Ед/л	1057,7	69,3	952,6	1157,4	1193,1	187,9	968,6	1631,0	12,81	0,088
Триглицериды	ммоль/л	0,4	0,1	0,2	0,5	0,4	0,1	0,2	0,5	5,00	0,733
Фосфор	ммоль/л	2,1	0,4	1,8	3,0	2,0	0,4	1,0	2,4	-7,30	0,961
Хлориды	ммоль/л	90,3	1,5	88,5	92,6	89,3	4,4	83,8	96,4	-1,16	0,591
Холестерин	ммоль/л	4,7	1,1	3,0	5,9	2,0	0,8	1,0	3,5	-56,90	0,003

Кетоновые тела являются мощными этиологическими факторами развития гепатопатологии у крупного рогатого скота[10]. Кетоны, как и другие эндотоксины, могут индуцировать развитие гепатоцеллюлярного некроза посредством прямого или косвенное воздействие на орган. Косвенное влияние выражается в цитолитическом действии эндотоксина на клетки Купфера, вследствие чего высвобождаются лизосомальные ферменты, простагландины, и коллагеназы, обуславливая повреждение гепатоцитов. Под прямым действием подразумевается взаимодействие эндотоксинов непосредственно с гепатоцитами, вызывая повреждение лизосом, снижение функции митохондрий и некроз. Вследствие негативного влияния эндотоксинов происходит снижение общего кровотока печени и как следствие гипоксия печени [7]. В ходе изучения метаболической кар-

тины у клинически больных коров установлена тенденция к накоплению в крови трансаминаз (аспартатаминотрансферазы), лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы. Так, активность АСТ и ЛДГ у коров с признаками кетонемии в среднем составила 91,3±23,6 Ед/л и 1193,11±187,9 Ед/л, что на 13,91% и 12,81% выше средних показателей группы здоровых коров. Активность гаммаглутамилтрансферазы достоверно не отличались в сравнительном аспекте изучаемых групп. Полученные метаболические изменения указывают на развитие у животных синдрома цитолиза гепатоцитов, обусловленного нарушением проницаемости клеточных мембран или распадом мембранных структур с выходом в плазму описанных индикаторных ферментов.

Исследования метаболических показателей коров с клиническими признаками алиментарного кетоза показывают, что признаки поражения почек не являются ярко выраженным симптомом данной патологии. Тем не менее, у коров с признаками кетонурии регистрируется слабая тенденция к накоплению мочевины и креатинина в плазме крови. Содержание креатинина и мочевины у больных коров было в среднем на 6,1 и 26,9 % выше, чем в группе здоровых.

ВЫВОДЫ. Проведенными исследованиями установлены главные клинические, гематологические и биохимические особенности у высокопродуктивных коров при развитии алиментарного кетоза. Развитие алиментарного кетоза сопровождается возникновением целого ряда патобиохимических реакций, к наиболее важными из которых следует относить: синдром трофической недостаточности, интоксикационный синдром и местный воспалительный процесс. Метаболические изменения характеризуются нарушением большинства видов обмена, при относительно слабом изменении параметров кислотно-основного состояния, и высокой функциональной нагрузке на гепатобилиарную систему.

Литература

Афанасьева, А.И. Продуктивные и воспроизводительные показатели коров красной степной породы при различных типах кормления [Текст] / А.И. Афанасьева, В.Г. Огуй, С.А. Галдак // Вестник алтайского государственного аграрного университета. – 2007. – №5(31). – С. 33–34.

Донник И.М. Мониторинговые исследования микотоксинов в уральском регионе / И.М. Донник, Н.А. Безбородова, О.С. Бодрова, Я.Ю. Подчезерцева // Ветеринария Кубани, 2009. № 1. С. 13-15.

Лавин, Н. Эндокринология : учебно – метод. пособие / Н. Лавин, В.И. Кандрора, Э. А. Антуха,Т. Г. Горлина пер. с англ.- М.: Практика.- 1999.С. 1128

Кеттайл, В.М. Патофизиология эндокринной системы: учеб.-метод. пособие В.М. Кеттайл, Рональд А. Акри пер с англ., под редакцией Н.А.Смирнова, СПб.-М.:»Невский диалект» - «Издательство БИНОМ», 2001 .- 336 с., ил

Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: учеб-метод пособие / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. – М.: КолосС, 2007. – 224 с.

Шкуратова, И.А. Нормализация обменных процессов и воспроизводительной функции племенных первотелок / И.А.Шкуратова, М.В. Ряпосова, И.А. Рубинский //Ветеринария, 2011.- № 8., С. 11-13.

Foreman, J.H. Acute Hepatitis in Large Animals / J.H. Foreman , 2016 Электрон. дан. – Режимдоступа: http://www.msdvetmanual.com/digestive-system/hepatic-disease-in-large-animals/acute-hepatitis-in-large-animals

Herdt,T. H. Overview of Ketosis in Cattle (Acetonemia, Ketonemia) T. H. Herdt, 2016Электрон. дан. – Режимдоступа: http://www.msdvetmanual.com /metabolic-disorders/ketosis-in-cattle/overview-of-ketosis-in-cattle

Kaneko J. Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition) / J. Kaneko, J.W. Harvey.M. L. Bruss, 2008.-928 p.

MasoudDavoudi S. Study of Hepatic Problems in livestock / S. MasoudDavoudi // European Journal of Zoological Research, 2013, 2 (4): 124-132

УДК 619:616.995.132.6

TRICHINELLA SPIRALIS КАК ИНГИБИТОР ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Бережко В.К., д.б.н., профессор, заведующая лаборатории иммунодиагностики паразитозов и клеточной технологии, vigis.ds@yandex.ru,

Новик Т.С., д.б.н., профессор, в.н.с. лаборатории экспериментальной терапии, novik.tamara@mail.ru,

Ковешникова Е.И., к.б.н., с.н.с. лаборатории экспериментальной терапии, koveshnikova.e.i@yandex.ru,

Данилова Т.И.[*], с.н.с. лаборатории молекулярной и клеточной биологии,

Написанова Л.А. к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунодиагностики паразитозов и клеточной технологии, napisanova2015@yandex.ru,

Тхакахова А.А., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунодиагностики паразитозов и клеточной технологии, amina7161@yandex.ru,

Чукина С.И., к.б.н., с.н.с., лаборатории экспериментальной терапии, feruza7491@mail.ru,

Камышников О.Ю., аспирант лаборатории экспериментальной терапии,raddabayoleg@gmail.com,

Руднева О.В., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунодиагностики паразитозов и клеточной технологии, dotana@mail.ru

ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, РФ, 117218 г. Москва, ул. Б.Черемушкинская, д.28.,тел.: (499) 124-56-55

[*]Институт молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, РФ, 119435, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4, тел.:(499) 248-05-53

Проведена оценка антипролиферативного действия экстракта из мышечных личинок Trichinella spiralis на культуру клеток рака молочной железы человека – MCF-7. Для тестирования использовали концентрации экстракта – 12,5; 25; 50; 100; 250; 500 мкг/мл,1 мг/мл и

2 мг/мл. Визуальный осмотр, проведенный через 24 часа после внесения исследуемого белкового экстракта Trichinella spiralis в экспериментальные лунки, показал сопоставимость опухолевой клеточной культуры при дозе экстракта от 12,5 до 250 мкг/мл. Через 72 часа культивирования при дозе экстракта 1 мг/мл и 2 мг/мл отметили ингибирование пролиферативной активности и снижение количества жизнеспособных клеток в 2,0 и 2,3 раза. Снижение тотального количества опухолевых клеток наблюдали при концентрации экстракта 500 мкг/мл и 1 мг/мл. При дозе экстракта 2 мг/мл произошли также морфологические изменения в клетках в виде многочисленной зернистости в цитоплазме. Последующие наблюдения, проведенные на 6-е сутки после внесения в культуру опухолевых клеток белкового экстракта Trichinella spiralis, показали, что при максимально испытанной концентрации в дозе 2 мг/мл произошла 100%-ная гибель клеток, а на 7-е сутки после внесения в лунки испытуемого экстракта, при концентрации 500 мкг/мл отметили заметное снижение пролиферативной активности опухолевых клеток и проявление цитостатического действия при дозе 100 мкг/мл.

Полученные результаты являются убедительным доказательством наличия у Trichinella spiralis противоопухолевых субстанций, проявляющих антипролиферативное действие на рост и развитие опухолей, и ингибирующих метастазирование. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования в этом направлении, что приблизит нас к созданию специфических профилактических средств против ряда онкологических заболеваний.

Ключевые слова: Trichinella spiralis, личинки, экстракт, опухолевые клетки MCF-7.

TRICHINELLA SPIRALIS AS AN INHIBITOR OF TUMOR CELL PROLIFERATION

Berezhko V.K., Novik T.S., Koveshnikova E.I., Danilova T.I.*, Napisanova L.A., Thakakhova A.A., Kamyshnikov O.Yu, Rudneva O.V.

ARSRJP - Branch of the Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterenari Medicina K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko the RAS», 117218, B. Cheremushkinskaya St., 28, Moscow, Russia, tel.: (499) 124-56-55

*Institute of Molecular Medicine I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 202, 203. 2-4 Bolshaya Pirogovskaya st ., Moscow 119435, Russia, tel.:(499) 248-05-53

The antiproliferative effect of the extract from the muscle larvae of Trichinella spiralis on the culture of human breast cancer cells MCF-7 was assessed. The following extract concentrations were used for testing: 12.5; 25; 50; 100; 250; 500 pg/ml, 1 mg/ml and 2 mg/ml. Visual examination carried out 24 hours after application of the Trichinella spiralis protein extract to the experimental wells showed comparability of the tumor cell culture at an extract dose from 12.5 up to 250 pg/ml. After 72 hours of cultivation at an extract dose of 1 mg/ml and 2 mg/ml, inhibition of proliferative activity and a decrease in the number of viable cells of 2.0 and 2.3 times were noted. A decrease in the total number of tumor cells was observed at an extract concentration of 500 pg/ml and 1 mg/ml. There were also morphological changes in the cells in the form of numerous granulosity in the cytoplasm at an extract dose of 2 mg/ml. Subsequent follow-ups carried out on the 6th day after application of Trichinella spiralis protein extract to the culture of tumor cells showed that 100% cell death occurred at the maximum tested concentration of 2 mg/ml, and on

the 7th day after application of the test extract to the wells markedly reduced proliferative activity of tumor cells at a concentration of 500 pg/ml and manifestation of cytostatic action at a dose of 100 pg/ml were noted.

The obtained results are convincing proof of the presence of antitumor substances in Trichinella spiralis having antiproliferative effect on growth and development of tumors, and inhibiting metastasis. In this regard, further research is needed in this direction. It will bring us closer to creating specific preventive medications against a number of oncological diseases.

Key words: Trichinella spiralis, larvae, extract, MCF-7 tumor cells

Введение. В 1931 г. в научной литературе появилась публикация об антагонистическом взаимодействии между болезнью Чагаса, возбудителем которого являются жгутиковые простейшие Trypanosoma cruzi, и развитием злокачественных опухолей (4).

Экспериментально было установлено, что T. cruzi паражает раковые клетки и подавляет рост и развитие различных злокачественных опухолей и опухолевых клеток (3).

С этого момента интерес к подобным исследованиям не только значительно активизировался, но появились работы, свидетельствующие об аналогичном действии на рост и развитие злокачественных опухолей различных видов гельминтов (7, 8, 5, 1, 6 и др.).

Так, было показано, что заражение мышей в дозе 200 личинок T. spiralis за 176 суток до подкожной прививки им 5×10^5 жизнеспособных клеток миеломы В 16 предохраняло от развития опухолевых узелков, тогда как незараженные мыши пали в течение 60 суток (7). Рост опухоли миеломы В16 подавлялось у мышей-самцов линии С57BL/6 с хроническим трихинеллезом (8).

Противоопухолевую резистентность к раку молочной железы, индуцированной 7,12-диметилбензоантраценом, регистрировали у крыс, зараженных T. spiralis, в то время как подобного действия эти личинки не проявили в отношении злокачественных фиброзных гистиоцитом, индуцированных у крыс 3,4-бенэпиреном (1).

Имеются также данные о том, что аналогичное действие на развитие различных злокачественных новообразований проявляют экстракты из гельминтов (10, 9, 2).

Представленные научные публикации являются убедительным основанием как для продолжения исследований в плане изучения антипролиферативного и цитотоксического действия разных видов гельминтов на опухолевые клетки различных линий, так и для установления в дальнейшем активной действующей субстанции в их составе, проявляющей подобные действия.

Цель настоящей работы – изучение влияния белково-антигенного экстракта из мышечных личинок T. spiralis на культуру клеток рака молочной железы человека.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на перевиваемой клеточной линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека). Исследовали действие экстракта из T. spiralis на рост и развитие клеточной линии рака MCF-7. Белково-антигенный экстракт готовили путем измельчения замороженных личинок T. spiralis до получения однородной массы-гомогената, последующего экстрагирования белков на магнитной мешалке в течение 16 часов при 4^0C в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 в соотношении 1:5 и центрифугирования при 18000 об/мин в течение часа при 4^0C. Перед опытом экстракт стерилизовали через миллипоровый фильтр 0,22 микрона, для тестирования использовали концентрации 12,5; 25; 50; 100; 250; 500 мкг/мл; 1 мг/мл и 2 мг/мл.

Разведения готовили на ростовой среде ДМЕМ GlutaMAX (DGIBCO) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и антибиотиком.

Перед проведением основного эксперимента клетки MCF-7 инкубировали по стандартной методике в ростовой среде ДМЕМ GlutaMAX (DGIBCO) с 10% FBS и антибиотиком/антимикотиком (Gibco×100) в условиях повышенной влажности CO_2-инкубатора при 37^0C и 5% CO_2 до получения субконфлуэнтного монослоя.

Приготовленную суспензию клеток высевали в 24-луночные планшеты по 30×10^3 клеток в лунку и культивировали сутки в условиях CO_2-инкубатора. Затем из лунок полностью удаляли среду и в экспериментальные лунки вносили ростовую среду с исследуемыми концентрациями экстракта T. spiralis, по три повтора на каждую дозу. Контролем служили клетки на полной ростовой среде без экстракта.

Ежедневно вели светооптическое наблюдение за характером роста и морфологией клеток, используя инвертированный микроскоп Olympus CK (Japan).

Эффективность культивирования оценивали после подсчета клеток в камере Горяева по формуле:

$$C=n\times1111;$$

где C – концентрация клеток в образце (кл/мл)

n – количество клеток во всех квадратах.

Жизнеспособные клетки рассчитывали в процентах относительно контроля по формуле:

$$Кж= (N0/Nk) \times 100\%, \text{ где}$$

Кж – жизнеспособные клетки (%);

No – количество живых клеток в экспериментальной лунке

Nk – количество живых клеток в контрольной лунке.

Результаты. Визуальный контроль, проведенный через 24 часа, показал, что во всех лунках с белковым экстрактом T. spiralis

клетки сопоставимы с контролем как на плотности и размеру пролиферирующих колоний, так и по морфологическим признакам.

При визуальном осмотре через 72 часа в контрольных лунках отметили активную пролиферацию опухолевых клеток со сформированным плотным монослоем и отсутствием детрита. В экспериментальных лунках с экстрактом T. spiralis при концентрации от 12,5 до 250 мкг/мл плотность клеточного монослоя была сопоставима с контрольными лунками.

Дентрит отсутствовал, клетки морфологически не отличались. Снижение тотального количества клеток произошло при концентрации экстракта 2 мг/мл, помимо значительного уменьшения размеров и количества клеточных колоний, отметили морфологические изменения в клетках, а именно появление в цитоплазме многочисленной зернистости в виде мелкой черной дроби. На этом сроке исследования клетки снимали и подсчитывали в камере Горяева их количество и жизнеспособность. Результаты этого анализа показали, что экстракт T. spiralis через 72 часа культивирования ингибирует пролиферативную активность и снижает количество жизнеспособных опухолевых клеток в 2,0 и 2,3 раза (табл. 1).

Таблица 1. Количество клеток в контроле и в экспериментальных лунках через 72 часа после внесения белкового экстракта T. spiralis в испытанных концентрациях

№ п/п	Концентрация экстракта T. spiralis	Количество клеток в камере Горяева	Общее количество клеток в лунке	Жизнеспособные клетки (%)
1	Контроль	185	411×10^3	100
2	25 мкг/мл	175	389×10^3	94,6
3	50 мкг/мл	150	334×10^3	81,3
4	100 мкг/мл	140	310×10^3	75,4
5	250 мкг/мл	145	322×10^3	78,3
6	500 мкг/мл	140	310×10^3	75,4
7	1 мг/мл	94	208×10^3	50,6
8	2 мг/мл	79	175×10^3	42,6

Последующие визуальные наблюдения, проведенные на 6 сутки, показали, что при максимально испытанной концентрации экстракта – 2 мг/мл произошла 100%-ная гибель клеток, в то время как в контрольных лунках был сформирован субконфлюэтный монослой без детрита.

В этот срок отметили также заметное снижение пролиферативной активности MCF-7 клеток в лунках с дозой экстракта 1 мг/мл. Плотность клеток была ниже и в них появились цитоплазматические включения в виде темной зернистости.

В лунках с меньшей концентрацией экстракта морфологических изменений клеток не отметили, они были сопоставимы с контролем. Однако визуальный контроль и подсчет клеток, проведенный на 7 сутки, показал заметное снижение пролиферативной активности опухолевых клеток уже при концентрации 500 мкг/мл и в еще большей степени при концентрации 1 мг/мл. В контрольных лунках наоборот наблюдали активную пролиферацию MCF-7 клеток с формированием монослоя и без морфологических изменений в клетках. При подсчете, проведенном в этот срок в камере Горяева, было показано снижение как общего количества, так и числа жизнеспособных клеток в 2-3 раза при концентрации экстракта T. Spiralis 500 мкг/мл и 1 мг/мл. Причем цитостатическое действие экстракта к этому сроку проявилось уже при концентрации 100 мкг/мл с последующей активизацией его действия, что свидетельствует о его дозозависимом характере. Концентрация экстракта 2 мг/мл на 7 сутки культивирования также приводила к полной гибели культивируемых опухолевых клеток, что является подтверждением его цитотоксического действия.

Заключение. Несмотря на достаточное количество научных публикаций, свидетельствующих о влиянии T. spiralis на рост и развитие различных линий опухолей, механизм ингибирующего эффекта остается невыясненным. Тем не менее исследователи отмечают,

что противоопухолевое действие может проявлять каждая стадия развития личинок трихинелл в организме хозяина.

Такой вывод базируется на том, что в одном случае противоопухолевое действие в отношении клеток миеломы В16 регистрировали при хроническом трихинеллезе, а в другом – при карциноме кардиального отдела желудка, асцитнойгепатомы и саркомы у мышей, которых за 7 суток до прививки им опухолевых клеток заразили личинками T. spiralis (7, 10).

Такой большой промежуток между заражением и ингибирующим действием по отношению к различным опухолям может быть следствием наличия у личинок трихинелл активных противоопухолевых субстанций или идентичных с опухолями антигенов.

Тем не менее, несмотря на антираковое действие личинок трихинелл при заражении, применение живых личинок паразита в этом качестве имеет потенциальную опасность. Именно поэтому дальнейшие исследования должны быть направлены на определении и по возможности выделении активных антираковых компонентов с целью изучения механизма взаимодействия между паразитарными инвазиями и злокачественными новообразованиями. Исследования в этом направлении приблизят к созданию средств для специфической профилактики ряда опухолей животных и человека.

Литература

1.Апанасевич В.И., Бритов В.А., Збань Ю.В. Противоопухолевая кроссрезистентность трихинелеза // Вопросы онкологии. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 223-226.

2.Бережко В.К., Новик Т.С., Ковешникова Е.И., Данилова Т.И., Написанова Л.А., Чукина С.И., Камышников О.Ю., Успенский А.В., Руднева О.В. Антипролиферативное действие экстракта из половозрелых Toxocara canis на моделях опухолевых клеток человека invitro// Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 2018. – № 1. – с. 32-36. ISSN: 0025-8326.

3.Каллиникова В.Д. Противоопухолевые свойства жгутикового простейшего Trypanosoma cruzi: Монография / В.Д. Калинникова; Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова. – М., 2004 (Тула: ИПП Гриф и К). – 278 с.

4.Роскин Г.И., Экземплярская Е.В. Протозойная инфекция и экспериментальный рак //Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1932. – Т. 9. – №. 3-С. – С. 339-349.

5.Bellelli C., Frosi A., Chiovoloni M., Grelloni, V., Baldelli, B. Trichinella spiralis as a modulator of Shope fibroma virus //Parassitologia. – 1989. – Vol. 31. – №. 2-3. – P. 145-152.

6.Kang Y.J., Jo J.O., Cho M.K., Yu H.S., Leem, S.H., Song K.S., Ock M.S., Cha H.J. Trichinella spiralis infection reduces tumor growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells.// Veterinary parasitology. – 2013. – Vol. 196 (1-2). – P. 106-113.

7.Molinari J.A., Ebersole J.L. Antineoplastic effects of long-term Trichinella spiralis infection on B-16 melanoma. //International Archives of Allergy and Immunology. – 1977. – Vol. 55(1-6). – P. 444-448.

8.Pocock D., Meerovitch E. The anti-neoplastic effect of trichinellosis in a syngeneic murine model //Parasitology. – 1982. – Т. 84. – №. 3. – С. 463-473.

9.Vasilev S., Ilic, N., Gruden-Movsesijan A., Vasilijic S., Bosic M., Sofronic-Milosavljevic L. Necrosis and apoptosis in Trichinella spiralis-mediated tumour reduction. //Central-European journal of immunology. – 2015. – Vol. 40(1). – P. 42-53.

10.Wang X.L., Fu B.Q., Yang S.J., Wu X.P., Cui G.Z., Liu M.F., Zhao Y., Yu Y.L., Liu X.Y., Deng H.K., Chen Q.J., Liu M.Y. Trichinella spiralis – A potential anti-tumor agent //Veterinary parasitology. – 2009. – Vol. 159. – №. 3-4. – P. 249-252.

УДК 615.371

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНОГО ИММУННОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КРУЦИНА И КЛЕТОЧНОГО АНТИГЕНА ПРОТОСКОЛЕКСОВ ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЬВЕОЛЯРНОМ ЭХИНОКОККОЗЕ

Бережко В.К.[1] доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией

Каллиникова В.Д.[2] доктор биологических наук, профессор

Руднева О.В.*[1] кандидат биологических наук, старший научный сотрудник (rudneva.olga79@gmail.com)

Написанова Л.А.[1] кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Сасикова М.Р.[3] кандидат биологических наук, начальник ветеринарной службы (vetkbr07@mail.ru).

[1] Лаборатория иммунодиагностики и клеточной технологии ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Москва, 117218, Большая Черемушкинская, 28. gny.vigis@yandex.ru

[2] Кафедра зоологии беспозвоночных МГУ. Москва, 119899, Воробьевы Горы, Биологический факультет.

[3] Ветеринарная служба УФСИН России по КБР (360030, КБР, г. Нальчик, ул. им. генерала А.С. Абидова, д. 2а).

Реферат. Представлены результаты по оценке иммунотерапевтического действия противоопухолевого препарата круцина в комплексе со специфическим антигеном из протосколексов

E.multilocularis при вторичном альвеолярном эхинококкозе на мышах. Препарат круцин, полученный из паразитических жгутиковых простейших вида Trypanosoma cruzi, известен более 80 лет как противораковое средство. В комплексе с клеточным антигеном протосколексов E.multilocularis круцин был испытан в качестве иммунотерапевтического средства на мышах, предварительно зараженных альвеолярным эхинококком. У мышей, которым через 15 дней после заражения подкожно вводили в течении 12 дней по 15 ЕД (1ЕД-1000 экз. T.cruzi) круцина в 0.2 мл стерильного физраствора с 60 мкг белка-антигена протосколексов E.multilocularis установили значительный терапевтический эффект. Масса развившихся ларвоцист паразита у таких мышей, во-первых не превышала 2,48±0,24 г, что в 4,45 раз меньше, чем у контрольных, а, во-вторых, в развившихся ларвоцистах паразита не было инвазивных зародышевых элементов, что было подтверждено биопробой.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности и целесообразности продолжения исследований в поиске наиболее эффективных иммунотерапевтических средств при вторичном альвеолярном эхинококкозе.

Ключевые слова: Trypanosoma cruzi, Echinococcus multilocularis, круцин, иммунотерапия, антигены, эхинококкоз, биопрепарат.

THERAPEUTIC PROPERTIES OF COMPLEX IMMUNE BIOPREPARATES BASED ON CRUCIN AND CELLULAR ANTIGEN OF PROTOSCOLEX E.MULTILOCULARIS IN EXPERIMENTAL ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS

Berezhko V.K., Каллиникова В.Д., Rudneva O.V., Napisanova L.A.., Sasikova M.R.

Abstract. The results of the evaluation of the immunotherapeutic effect of an antitumor preparation of crucin in a complex with a specific antigen from the protoscolex E.multilocularis in secondary alveolar

echinococcosis in mice are presented. The drug crucin, derived from the parasitic flagellate protozoan species Trypanosoma cruzi, is known for more than 80 years as an anticancer agent. In combination with the cell antigen of protoscolex E.multilocularis, crucin was tested as an immunotherapeutic agent in mice previously infected with alveolar echinococcus. In mice, which were injected subcutaneously 15 days later with 15 ED (1 AD-1000 copies of T.cruzi), 0.2 ml of sterile saline with 60 μg of antigen protein protoscolex E.multilocularis established a significant therapeutic effect. The mass of developed larvocyst parasite in such mice, firstly did not exceed 2-3 g, which is 6 times less than in control mice, and secondly, there were no invasive germ cells in the developed larvocysts of the parasite, which was confirmed by bioassay.

The obtained data testify to the prospects and expediency of continuing research in the search for the most effective immunotherapeutic agents in secondary alveolar echinococcosis.

Key words: Trypanosoma cruzi, Echinococcus multilocularis, crucin, immunotherapy, antigens, echinococcosis

Введение. Альвеолярный эхинококкоз, возбудителем которого является Echinococcus multilocularis, относится к числу наиболее опасных паразитарных зоонозов. Характеризуется тяжелым хроническим течением с опухолевидными поражениями различных органов и систем, прежде всего, печени. В отличие от повсеместно распространенного цистного эхинококкоза (Echinococcus granulosus), альвеолярный эхинококкоз встречается очагово. Довольно широко цистная и альвеолярная формы эхинококкоза распространены в России [5, 14]. Эпидемиологическая ситуация по эхинококкозам в РФ по данным Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека остается сложной. Ежегодно в РФ регистрируется свыше 500 случаев эхинококкоза, причем в структуре заболевания 14,5% составляют дети.

В борьбе с ларвальной стадией альвеолярного эхинококкоза помимо хирургического метода наиболее приемлемым и применимым является химиотерапия. Но даже в этом случае этот способ малоэффективен, поскольку помимо развития резистентности паразита к терапевтическому препарату в процессе лечения происходит только приостановка его развития, а не окончательная гибель, что впоследствии приводит к возобновлению заболевания и возникновению метастазов. Имеются сообщения о профилактике вторичного альвеолярного эхинококкоза с использованием специфических антигенных препаратов в комплексе с неспецифическими иммуностимулирующими средствами, в том числе и с противоопухолевым препаратом круцин [1, 3, 4, 9, 15].

Однако все эти исследования предусматривали оценку протективных свойств антигенных препаратов к заражению E.multilocularis, в то время как иммунотерапия – это способ лечения уже инвазированного организма. В отношении альвеолярного эхинококкоза имеется сообщение Boubaker et al. об использовании в качестве иммунотерапевтического средства рекомбинантной вакцины к E.multilocularis (rEmP29) [10]. О комбинированной терапии эхинококкоза печени с использованием препарата альбендазола и иммуномодулятора иммунофан, имеются сообщения Дударева В.А. и Стрельникова А.Г.[6], которые так же обозначили такой подход как иммунотерапия.

Об эффективности круцина как противоракового биопрепарата, действующего на опухоли различной гистологической природы у человека, известно давно [8]. Противораковый эффект выражался в патологических изменениях опухоли, отличных от обычного некроза («расплавление» злокачественных клеток) [7]. По данным французских исследователей, использовавших метод иммунофлуоресценции для изучения действия трипанозы (аналог круцина, сделанный во

Франции) на раковые клетки in vitro в культурах тканей, а также in vivo, препарат очень быстро действовал на ядро злокачественных клеток и приводил к подавлению митотической активности, а in vivo – к разрушению раковых клеток, гистологическим изменениям опухоли, активизации защитных сил организма и к замещению опухолевой ткани соединительной [11,12,13] (цитировано по В.Д. Калинниковой, 2004).

С учетом этих научных данных была поставлена цель – оценить иммунотерапевтическое действие препарата круцина в комплексе с антигеном протосколексов E.multilocularis при вторичном альвеолярном эхинококкозе.

Материалы и методы. Инвазивный материал - протосколесы E.multilocularis для проведения эксперимента получали от предварительно зараженных белых беспородных мышей. Специфический антиген, представляющий собой продукты метаболизма культивируемых клеток протосколексов E. multilocularis в искусственной питательной среде, получали по методике Бережко В.К. с соавт [2].

Исследование провели на 36 белых беспородных мышах, массой 16-18г, распределенных на 3 равноценные группы. Все подопытные мыши были заражены внутрибрюшинно протосколексами и ацефалоцистами E.multilocularis, выделенными от мышей-доноров, в дозе 200±50 экз./мышь.

Спустя 15 дней после заражения первой группе мышей в качестве иммунотерапевтического средства вводили подкожно противоопухолевый препарат круцин в течение 12 дней в дозе 15 ЕД (1 ЕД содержит 1000 экз. T.cruzi) в 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Мышам второй группы вводили препарат круцин в той же дозе в течение 12 дней вместе с клеточным антигеном протосколексов E.multilocularis в дозе 60 мкг белка в 0,2 мл физиологического

раствора. Мыши 3-й группы (контроль) получали в те же сроки подкожно по 0,2 мл стерильного физиологического раствора.

Убой и вскрытие подопытных мышей проводили через 117 дней после заражения. В процессе вскрытия определяли массу развившихся ларвоцист паразита по отношению к массе тела подопытных мышей, наличие в них зародышевых элементов, их инвазивность, которую устанавливали биопробой на белых беспородных интактных мышах.

Обработка данных осуществлялась методами математической статистики с использованием ПК.

Результаты и обсуждение. Установили, что у мышей 1-й группы масса развившихся ларвоцист составляла 6,93±0,42 г от массы тела, что в 1,60 раза меньше, чем в контрольной группе. При более тщательном обследовании определили, что основная масса (83,3%) не содержала полноценных зародышевых элементов. У 2-х мышей этой группы (16,7%) были обнаружены ларвоцисты с протосколексами и ацефалоцистами, инвазивность которых была подтверждена впоследствии проведенной биопробой на интактных мышах (табл).

Исследование мышей 2-й группы показало, во-первых, что масса развившихся ларвоцист у подопытных мышей не превышала 2,48±0,24 г от общей массы тела хозяина, а, во-вторых, отсутствие в развившихся ларвоцистах паразита инвазивных зародышевых элементов. Одна мышь из этой группы оказалась свободной от инвазии. Последующая проведенная биопроба на интактных белых мышах по проверке инвазивных свойств зародышевых элементов из развившихся ларвоцист показала отрицательный результат.

Что касается мышей 3-й, контрольной группы, то все они оказались зараженными (табл.). Развившиеся у них ларвоцисты составляли 11,10±0,46 г от массы тела со сформированными

протосколексами, инвазивность которых была впоследствии подтверждена биопробой на мышах.

Таблица. Иммунотерапевтическое действие противоопухолевого препарата круцина в комплексе с клеточным антигеном протосколексов E.multilocularis при вторичном альвеолярном эхинококкозе.

№ п/п	Кол-во мышей в группе	Доза заражения E.multilocularis, протосколексы, экз.	Иммунотерапевтическое средство, доза, способ введения	Кол-во вылеченных мышей, масса развившихся ларвоцист, наличие инвазивных элементов
1	12	200±50	Круцин, 12 инъекций подряд по 15 ЕД (1ЕД - 1000 экз. T.cruzi) в 0,2 мл стерильного физ. раствора подкожно	Масса развившихся ларвоцист 6,93±0,42 г массы тела, без зародышевых элементов; У 2 мышей обнаружены ларвоцисты с инвазивными зародышевыми элементами
2	12	200±50	Круцин, 12 инъекций подряд по 15 ЕД (1ЕД -1000 экз. T.cruzi) + 60 мкг антигена протосколексов E.multilocularis в 0,2 мл стерильного физ. раствора, подкожно	У одной мыши ларвоцисты не обнаружены. У 11 мышей масса развившихся ларвоцист E.multilocularis 2,48±0,24 г от массы тела мыши, без зародышевых элементов
3	12	200±50	12 инъекций 0,2 мл стерильного физ.раствора, подкожно	У 12 мышей развившиеся ларвоцисты массой 11,10±0,46 г с инвазивными зародышевыми элементами.

Исходя из полученных данных было сделано заключение, что терапевтический эффект значительно усиливался при одновременном использовании биопрепарата круцина со специфическим антигеном.

Заключение. Экспериментальными исследованиями на лабораторной модели E.multilocularis – мышь установлено, что противо-

опухолевый препарат круцин, представляющий собой лиофилизированные одноклеточные организмы-паразитические жгутиковые простейшие Tripanasoma cruzi, обладает ингибирующим действием в отношении вторичных ларвоцист E.multilocularis. Этот процесс характеризуется уменьшением массы развившихся ларвоцист паразита и отсутствием в большинстве (83,3%) из них зародышевых элементов по сравнению с контрольными животными Установлено значительное повышение терапевтической эффективности при одновременном использовании круцина со специфическим антигеном из протосколексов паразита. В этом случае масса развившихся ларвоцист E.multilocularis была в 4,45 раз меньше, чем у контрольных мышей и все они не содержали инвазивные зародышевые элементы, что было подтверждено биопробой на интактных мышах. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований в поиске наиболее эффективных иммунотерапевтических средств при вторичном альвеолярном эхинококкозе.

Литература

Бережко В.К., Клёнова И.Ф., Коваленко Ф.П. (2001) Иммунопрофилактические свойства антигенов клеточной культуры метацестоды Ehinococcus multilocularis при экспериментальном альвеолярном гидатидозе мышей // Труды Всерос. ин-та гельминтол. – 2001. – т. 37 – С. 34-41.

Бережко В.К., Кленова И.Ф., Сивкова Т.Н., Коваленко Ф.П., Бессонов А.С., Написанова Л.А., Гламаздин И.Г. (2003) Способ получения диагностического антигена цестод // Патент на изобретение №2219551 20.12.2003., бюл № 35

Бережко ВК, Руднева ОВ, Успенский АВ, Сасикова МР (2017) Иммуномодуляторы в комплексе с антигеном из протосколексов Echinococcus multilocularis в профилактике экспериментального альвеолярного эхинококкоза // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2017 - № 3. - с.20-24

Бережко В.К., Сасикова М. Р. (2010) Антигены клеточной культуры протосколексов Ehinococcus multilocularis в иммунопрофилактике эхинококкоза (Ehinococcus granulosis) собак // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС –2010. вып.11. – С. 55 – 58.

Бессонов А.С. (2003) Альвеолярный эхинококкоз и гидатидоз. - М., 2003. - С. 75-100.

Дударев В.А., Стрельников А.Г (2009) Комбинированная терапия в лечении эхинококкоза печени // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2009. - №1.-стр.66.

Калинникова В. Д. (2004) Противоопухолевые свойства жгутикового простейшего Trypanosoma cruzi. // М.: ИПП Гриф и Ко, 2004г. 278 с

Клюева Н.Г., Роскин Г.И., (1946) Биотерапия злокачественных опухолей. // М. Издательство Академии медицинских наук СССР 1946г. 224 с.

Сасикова М.Р., Бережко В.К. (2007) Защитные свойства иммуномодулятора гала – вет в комплексе с клеточным антигеном Ehinococcus multilocularis при экспериментальном гидатидозе. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 2007. – № 4. – С. 26 -28.

Boubaker G, Hemphill A, Huber CO, Spiliotis M, Babba H, Gottstein B (2015) Prevention and Immunotherapy of Secondary Murine Alveolar Echinococcosis Employing Recombinant EmP29 Antigen. PLoS Negl Trop Dis 9(6): e0003795. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003795

Coudert J (1956) Reshershes experimentales et cliniques sur I'action d'un extrait Iyophilisee de Trypanosoma cruzi vis-a-vis de queques neoplasies. Sem hop Paris 52 (74): 3947-3954

Coudert G and Juttin P (1950) Note sur I'action d'un Iysat de Trypanosoma cruzi vis-a-vis d'un cancer grecfe du rat. C R Soc BioI 44(11-12) : 847-849

Coudert J, Battesti MR and Papageorgion C (1960) Modification de I 'induce mitotique des cellules neoplasiques en culture (souch K 13) sous I 'influence d' un extrait de Trypanosoma cruzi. C R Soc Bioi 154(3): 612-615

Kovalenko F, Darchenkova N, Legonkov Y, Musaev G, Gudovsky L, Parshin V, et al. (2000) Hydatid diseases (cystic and alveolar) in Russia (1983–1997). // Acta Parasitol. 2000;45:241–2.

Rudneva O.V., Berezhko V.K., Sasikova M.R. (2016) Immunoprophylaxis of secondary alveolar echinococcosis by a immunostimulation ribotan combined with antigen protoscolex cells of Echinococcus multilocularis // Ad Alta: Journal of Interdisciplinary Research . 2016, Vol. 6 Issue 1, p. 88-91. 4p.

УДК 619:614.48:636.59

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ПОЧВЫ

Бутко М.П., д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник.

Попов П.А., канд. биолог.наук, старший научный сотрудник.

Онищенко Д.А., канд. биолог.наук, научный сотрудник.

Осипова И.С., канд. вет. наук, старший научный сотрудник,

vniivshe-mp@mail.ru

Лаборатория ветеринарно-санитарной экспертизы

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН», РФ, 123022, г. Москва, Звенигородское ш., д.5, 8-499-256-35-81

Резюме. В статье представлены результаты лабораторных опытов по определению эффективности применения препарата Гипонат-БПО для дезинфекции различных видов почв (чернозем, подзолистая, торфяная, суглинистая, песчаная) при контроле по тест-культурам St.aureus (шт. 209-Р) и Bac. cereus (шт. 96) с определением эффективных режимов применения препарата для вегетативной и споровой микрофлоры. На основании результатов опытов средство Гипонат-БПО может быть рекомендовано для проведения профилактической и текущей дезинфекции различных видов почв.

Ключевые слова: Гипонат-БПО, дезинфекция, тест-культуры, экспозиция, виды почв.

APPLICATION OF COMPOSITE PREPARATION BASED ON SODIUM HYPOCHLORITE FOR DISEASE DISINFECTION

Butko M. P., Popov P.A., Onishenko D. A., Osipova I.S.

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center – K. I. Skryabin, Ya. R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences»123022, Moscow, Russian Federation+7(499) 256-54-73, vniivshe@mail.ru

The results of laboratory experiments to determine the effectiveness of Hyponate-BPO for the disinfection of various soil types (chernozem, podzolic, peat, loamy, sandy) under control of test cultures are presented in the article. aureus (pcs 209-P) and you. cereus (pcs 96) with the definition of effective regimens for the use of the drug for vegetative and spore microflora. Based on the results of the experiments, Hyponate-BPO can be recommended for preventive and current disinfection of various soil types.

Key words: Hyponate-BPO, disinfection, test culture, exposition, types of soils.

Материалы и методы. Согласно Государственному заданию(раздел № 0578.06-2016-0002), на первом этапе провели лабораторные исследования нового многокомпозиционного дезинфицирующего средства Гипонат-БПО, созданного из пяти компонентов на основе гипохлорита натрия. Были испытаны его бактерицидные и бактериостатические свойства, а также дезинфицирующее действие с применением тест-культур St.aureus (шт. 209-Р) и Bac.cereus (шт. 96) с определением экспозиции и концентрации. На данный препарат подготовлена заявка на патент РФ.

На втором этапе провели лабораторные опыты по разработке режимов дезинфекции различных видов почв дезинфицирующим

раствором препарата Гипонат-БПО. Для этого были отобраны пробы нескольких видов почв, а именно черноземные, подзолистые, торфяные, суглинистые и песчаные, которые предварительно автоклавировали, а затем размещали в пластиковые емкости и утрамбовывали до высоты столба почвы 25 см, а площади поверхности 70 $см^2$. Далее готовили 100 мл взвеси суточной культуры St.aureus (шт. 209-Р) при концентрации $2*10^8$КОЕ/мл. Затем всем объемом микробной суспензии частями по 10 мл равномерно пропитывали поверхности указанных почв, что составило 1,52 мл/$см^2$. После этого на поверхность почв наносили препарат Гипонат-БПО (без разведения) в количестве 100 мл частями, давая пропитываться почве. Экспозиция обработки составляла 60 и 120 мин. Для контроля эффективности дезинфицирующего действия препарата отбирали пробы с глубины 3 см металлическим шпателем и производили посев на МПА 8,5% с NaCl.

Аналогичным образом проводили опыты в отношении эффективности обеззараживании с применением семисуточной тест-культуры Bac.cereus (шт. 96). с использованием МПА. Учет результатов в обоих случаях проводили через 24 часа и 7 суток.

Результаты исследований. Результаты проведённых испытаний показали, что достигнуто обеззараживание почв с применением средства Гипонат-БПО при контроле по тест культуры St.aureus(шт. 209-Р) (см. таблицы 1 и 2)

Таблица 1. Результаты лабораторных опытов по эффективности препарата Гипонат-БПО при контроле по тест-культуре St.aureus (шт. 209-Р)

Вид почвы	Исходная концентрация тест-культуры для контаминации почвы	Экспозиция, мин.	Учет результатов, КОЕ/см^2		Эффективность, %
			24 часа	7 суток	
Черноземная	$2*10^8$	60	165	182	99,8
Подзолистая	$2*10^8$	60	172	191	99,7
Торфяная	$2*10^8$	60	65	80	99,9
Суглинистая	$2*10^8$	60	148	152	99,8
Песчаная	$2*10^8$	60	42	48	99,9
Черноземная	$2*10^8$	120	6	10	99,9
Подзолистая	$2*10^8$	120	8	11	99,9
Торфяная	$2*10^8$	120	0	0	100
Суглинистая	$2*10^8$	120	20	22	99,9
Песчаная	$2*10^8$	120	0	0	100

Как видно из таблицы 1, при дезинфекции всех видов почвы эффективность обеззараживания при экспозиции 60 мин составила 99,7-99,9%, а при экспозиции 120 мин – 99,9-100%.

С целью достижения 100% эффективности обеззараживания почв (суглинистой, подзолистой и черноземной) провели дополнительный опыт: предварительно почвы рыхлили и дополнительно вносили 50 мл дезинфектанта (при экспозиции 120 мин). Затем учитывали результаты по приведённой выше схеме. Данная модификация опыта обеспечивала 100% эффективность обеззараживания, что показано в табл. 2.

Таблица 2. Дополнительный опыт для достижения 100% эффективности обеззараживания черноземной, подзолистой и суглинистой почв при контроле по St.aureus (шт. 209-Р)

Вид почвы	Исходная концентрация тест-культуры для контаминации почвы	Экспозиция, мин.	Учет результатов, КОЕ/см^3		Эффективность, %
			24 часа	7 сут.	
Черноземная	2*10^8	120	0	0	100
Подзолистая	2*10^8	120	0	0	100
Суглинистая	2*10^8	120	0	0	100

Результаты проведённых испытаний показали, что достигнуто обеззараживание всех видов почв с применением средства Гипонат-БПО при контроле по тест культуре Bac.cereus (шт. 96), что представлено в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Результаты лабораторных опытов по эффективности препарата Гипонат-БПО при контроле по тест-культуре Bac.cereus (шт. 96)

Вид почвы	Исходная концентрация тест-культуры для контаминации почв	Экспозиция, мин.	Учет результатов, КОЕ/см^3		Эффективность, %
			24 часа	7 сут.	
Черноземная	2*10^8	120	96	120	99,8
Подзолистая	2*10^8	120	107	142	99,8
Торфяная	2*10^8	120	62	67	99,9
Суглинистая	2*10^8	120	147	162	99,7
Песчаная	2*10^8	120	51	62	99,9
Черноземная	2*10^8	180	42	47	99,9
Подзолистая	2*10^8	180	36	40	99,9
Торфяная	2*10^8	180	0	0	100
Суглинистая	2*10^8	180	90	100	99,9
Песчаная	2*10^8	180	0	0	100

Как видно из таблицы 3, эффективность обеззараживания всех видов почвы при экспозиции 120 мин составила 99,7-99,9%, а при экспозиции 180 мин – 100% эффективность достигнута только для торфяных и песчаных почвах.

С целью достижения 100% эффективности обеззараживания почв (суглинистой, подзолистой и черноземной) провели дополнительный опыт: предварительно почвы рыхлили и дополнительно вносили 50 мл дезинфектанта (при экспозиции 180 мин) затем учитывали результаты по приведённой выше схеме. Данная модификация опыта обеспечивала 100% эффективность обеззараживания, что представлено в таблице 4.

Таблица 4. Дополнительный опыт для достижения 100% эффективности обеззараживания черноземной, подзолистой и суглинистой почв при контроле по тест-культуре Bac.cereus (шт. 96).

Вид почвы	Исходная концентрация тест-культуры для контаминации почв	Экспозиция, мин.	Учет результатов, КОЕ/см^3		Эффективность, %
			24 часа	7 суток	
Черноземная	$2*10^8$	180	0	0	100
Подзолистая	$2*10^8$	180	0	0	100
Суглинистая	$2*10^8$	180	0	0	100

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что средство Гипонат-БПО обладает высокой дезинфицирующей активностью в отношении вегетативной и споровой микрофлоры при обработке различных видов почв (черноземные, подзолистые, торфяные, суглинистые и песчаные). На основании результатов опытов средство Гипонат-БПО может быть рекомендовано для проведения профилактической и текущей дезинфекции почв: для 100% обеззараживания почвы в отношении вегетативной микрофлоры является экспозиция 120 мин; для споровой микрофлоры время экспозиции составило 180 мин. Для эффективности обеззараживания тяжелых почв (чернозем, подзолистая и суглинистая) необходим предварительный процесс их рыхления.

УДК: 619:614.48 : 616.98

ТЕХНОЛОГИЯ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ ВЕТСАНОБЪЕКТОВ НОВЫМ ПРЕПАРАТОМ «АНОЛИТ АНК СУПЕР» В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Ваннер Н.Э., канд.вет.наук.старший научный сотрудник
Прокопенко А.А., д-р.вет. наук, главный научный сотрудник
Филипенкова Г.В., младший научный сотрудник
Лаборатория ветеринарно-санитарных технологий
Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологи – филиал ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»,
123022, Москва,РФ,тел/факс: (499) 256-35-81vniivshe@mail.ru
Бахир В.М., д-р техн.наук, проф., научный руководитель
Института электрохимических систем и технологий,
129515, Москва, РФ,тел/факс: (495) 187-37-27, vitold@bakhir.ru

В статье представлены результаты производственной апробации технологии дезинфекции производственных помещений и оборудования на птицефабриках направленными аэрозолями нового экологически безопасного препарата «Анолит АНК Супер», получаемого на установке СТЭЛ-АНК-СУПЕР путем электрохимической обработки раствора хлорида натрия в питьевой воде.

Установлено, что разработанная технология является эффективной и рекомендуется для ветеринарной практики. Ввиду отсутствия токсичности ЭХА-растворы могут использоваться в присутствии

персонала без ущерба для его здоровья. Способность к самодеградации ЭХА-растворов до воды и соли устраняет вероятность накоплений в окружающей среде. Функциональность растворов позволяет использовать их любыми доступными способами: орошение, погружение, замачивание и аэрозольный способ обработки.

Разработаны режимы и технология применения «Анолита АНК Супер» для дезинфекции инкубационных и товарных яиц при заболеваниях птицы аэрогенными инфекциями. ЭХА-растворы действуют на весь спектр патогенных микроорганизмов, включая споры.

По результатам исследований разработана и утверждена «Технология дезинфекции объектов ветеринарного надзора направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» (Утв. РАН 23.11.2016г.). Технология дезинфекции награждена Дипломом и Золотой медалью 19-й Российской агропромышленной выставки «Золотая осень-2017».

Ключевые слова*:* технология, дезинфекция, ЭХА-растворы (электрохимически активированные растворы), аэрозоли.

TECHNOLOGY OF AEROSOL DISINFECTION OF OBJECTS OF VETERINARY SUPERVISION BY NEW PREPARATION «ANOLITE ANK SUPER» IN PRODUCTION CONDITIONS

Wanner N.E., Prokopenko A.A., Filipenkova G.V.

Laboratory of Veterinary and Sanitary Technologies

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center – K. I. Skryabin, Ya. R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences» 123022, Moscow, Russian Federation, (499) 256-35-81, vniivshe@mail.ru

Bakhir V.M., Institute of Electrochemical Systems and Technologies
129515, Moscow, Russian Federation, (495) 187-37-27, vitold@bakhir.ru

The article presents the results of industrial testing of the technology of disinfection of industrial premises and equipment at poultry farms with directed aerosols of the new environmentally safe preparation "Anolyte ANK Super", produced by STEL-ANK-SUPER by electrochemical treatment of sodium chloride solution in drinking water. It is established that the developed technology is effective and recommended for veterinary practice. In view of the absence of toxicity, ECHA solutions can be used in the presence of personnel without damage to their health. The ability to self-degradation of ECHA solutions before water and salt eliminates the possibility of accumulation in the environment. Functionality of solutions allows to use them by any available methods: irrigation, immersion, soaking and aerosol treatment method. The modes and technology of application of "Anolyte ANK Super" for the disinfection of incubation and commercial eggs for poultry diseases by aerogenic infections have been developed. ECHA-solutions act on the whole spectrum of pathogenic microorganisms, including spores. According to the results of the research, "The technology of disinfection of veterinary surveillance facilities with directed aerosols of the preparation" Anolite ANK Super"(Compiled by the RAS on 11/23/2016) was developed and approved. The technology of disinfection was awarded with the Diploma and Gold Medal of the 19th Russian agroindustrial exhibition "Golden Autumn-2017".

Key words: technology, disinfection, ECHA solutions (electrochemically activated solutions), aerosols.

Введение. При создании новых, высокоэффективных и экологически безопасных препаратов в нашей стране перспективным является использование в ветеринарной практике электроактивирован-

ных растворов [1,3,9,10]. Из электроактивированных растворов для дезинфекции и лечения в медицине и ветеринарии начал использоваться нейтральный анолит АНК [2,3,7]. Нами разработана технология применения нейтрального Анолита АНК для дезинфекции объектов ветеринарного надзора [3,4,8]. В лабораторных условиях отработаны режимы и технология дезинфекции тест-объектов направленными аэрозолями Анолита АНК Супер. Установлено, что препарат обладает высокой дезинфицирующей активностью. Так, направленные аэрозоли Анолита АНК Супер при расходе его 0,15-0,3 л/м^2 обеззараживают поверхности тест-объектов, контаминированные микрофлорой и спорами за 3-24 ч.

Учитывая это, в задачи наших исследований входило:

– разработать режимы и технологию аэрозольной дезинфекции ветсанобъектов новым препаратом «Анолит АНК Супер» в производственных условиях.

Материалы и методы. Производственные опыты по апробации режимов и технологии дезинфекции направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» проведены на ветсанобъектах ФГУП ППЗ «Кучинский» Московской области – в помещениях для выращивания цыплят 1-140 сут, яйцесклада, убойного цеха и санбойни. Опыты проводили в соответствии с «Правилами проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного и ветеринарного надзора» (М., 2002г.). После очистки и мойки помещений ветсанобъекты были подвергнуты дезинфекции направленными аэрозолями «Анолита АНК Супер» с содержанием активного хлора 700 мг/л, с минерализацией 0,9 г/л, pH=5,0 с помощью аэрозольной установки «Унигрин» из расчета 200 мл/м^2 площади помещения. Экспозиция составляла 24 ч.

До дезинфекции и после экспозиции брали смывы с поверхностей и производили посев на среды МПА, солевой МПА, Эндо и Ча-

пека. Посевы выращивали в термостате при 37ºС для МПА, солевого МПА и Эндо в течение 24-48 ч, а на среде Чапека – при 22-25ºС в течение 5 сут. После этого проводили учет результатов бакпосевов.

Результаты исследований. Результаты опытов по изучению эффективности режимов и технологии дезинфекции поверхностей в помещениях яйцесклада приведены в табл. 1.

Таблица 1. Эффективность режимов и технологии дезинфекции поверхностей в помещениях яйцесклада направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер»

Места взятия смывов	Доза препарата л/м^2	Результаты бакисследований			
		МПА	СолевойМПА	Эндо	Чапека
До дезинфекции					
Сортировочное помещение					
Стена		+	+	+	+
Пол		+	+	+	+
Стол		+	+	+	+
Шкаф		+	+	+	+
Клетка		+	+	+	+
Складское помещение					
Стена		+	+	+	+
Пол		+	+	+	+
Стол		+	+	+	+
Шкаф		+	+	+	+
Клетка		+	+	+	+
После дезинфекции					
Сортировочное помещение					
Стена	0,20	-	-	-	-
Пол	0,20	-	-	-	-
Стол	0,20	-	-	-	-
Шкаф	0,20	-	-	-	-
Клетка	0,20	-	-	-	-
Складское помещение					
Стена	0,20	-	-	-	-
Пол	0,20	-	-	-	-
Стол	0,20	-	-	-	-
Шкаф	0,20	-	-	-	-
Клетка	0,20	-	-	-	-

Примечание: (+)– рост микроорганизмов имеется; (-)– рост отсутствует.

Из табл. 1 видно, что до дезинфекции все поверхности в помещениях яйцесклада были сильно обсеменены микрофлорой. После дезинфекции поверхностей направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» в дозе 0,2 л/м^2 и экспозиции 24 ч вся микрофлора была инактивирована, что свидетельствует о высокой эффективности режимов и технологии дезинфекции.

Результаты опытов по изучению эффективности режимов и технологии дезинфекции поверхностей помещений и оборудования в убойном цехе приведены в табл.2.

Таблица 2. Эффективность режимов и технологии дезинфекции помещений убойного цеха препаратом «Анолит АНК Супер»

Места взятия смывов	Результаты бак исследований			
	МПА	Солевой МПА	Эндо	Чапека
До дезинфекции				
Помещения для убоя птицы				
Стена	+	+	-	+
Пол	+	+	+	+
Стол	+	+	+	-
Емкость	+	+	-	-
Аппарат для снятия пера	+	+	+	-
Помещения для готовой продукции				
Стена	+	+	-	-
Пол	+	+	-	+
Стол	+	+	-	-
Тележка	+	+	-	+
Ящик	+	+	+	+
После дезинфекции				
Помещения для убоя птицы				
Стена	-	-	-	-
Пол	-	-	-	-
Стол	-	-	-	-
Емкость	-	-	-	-
Аппарат для снятия пера	-	-	-	-
Помещения для готовой продукции				
Стена	-	-	-	-
Пол	-	-	-	-
Стол	-	-	-	-
Тележка	-	-	-	-
Ящик	-	-	-	-

Примечание: (+)– рост микроорганизмов имеется; (-)– рост отсутствует.

Данные табл. 2 показали, что все поверхности в помещениях убойного цеха до дезинфекции были обсеменены общей микрофлорой, кишечной палочкой и стафилококками.а стены и полы – грибами.

В помещении для готовой продукции кишечной палочкой были обсеменены ящики, а грибами – полы, тележки и ящики.

После дезинфекции всех поверхностей помещений и оборудования направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» в дозе 200 мл/м^2 и экспозиции 24 ч микрофлора и грибы были полностью инактивированы, что свидетельствует о хорошей эффективности используемого препарата.

Результаты опытов по изучению эффективности режимов и технологии дезинфекции поверхностей и оборудования в птичнике для выращивания цыплят 1-140 сут приведены в табл.3.

Таблица 3. Эффективность режимов и технологии дезинфекции поверхностей в птичнике препаратом «Анолит АНК Супер»

Места взятия смывов	Доза препарата л/м^2	Результаты бак исследований			
		МПА	Солевой МПА	Эндо	Чапека
До дезинфекции					
Стена (бетон)		+	+	+	+
Пол (бетон)		+	+	+	+
Кормушка (пластик)		+	+	+	+
Поилка (пластик)		+	+	+	+
Перегородка (металл)		+	+	+	+
После дезинфекции					
Стена (бетон)	0,20	-	-	-	-
Пол (бетон)	0,20	-	-	-	-
Кормушка (пластик)	0,20	-	-	-	-
Поилка (пластик)	0,20	-	-	-	-
Перегородка (металл)	0,20	-	-	-	-

Примечание: (+) рост микроорганизмов имеется; (–) рост отсутствует.

Из табл.3 видно, что до дезинфекции все поверхности в птичнике были сильно обсеменены микрофлорой.

После дезинфекции поверхностей направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» в дозе 0,2л/м^2 и экспозиции 24 ч вся микрофлора была инактивирована, что свидетельствует о высокой эффективности разработанных режимов и технологии дезинфекции.

Результаты опытов по изучению эффективности режимов и технологии дезинфекции поверхностей и оборудования в санбойне приведены в табл. 4.

Таблица 4. Эффективность режимов и технологии дезинфекции поверхностей и оборудования в санбойне препаратом «Анолит АНК Супер»

Места взятия смывов	Доза препарата л/м^2	Результаты бак исследований			
		МПА	Солевой МПА	Эндо	Чапека
<u>До дезинфекции</u>					
Стена (бетон)		+	+	+	+
Пол (бетон)		+	+	+	+
Стол (металл)		+	+	+	+
Ведра (пластик, металл)		+	+	+	+
Тележка (металл)		+	+	+	+
Аппарат для снятия пера (металл)		+	+	+	+
<u>После дезинфекции</u>					
Стена (бетон)	0,20	-	-	-	-
Пол (бетон)	0,20	-	-	-	-
Стол (металл)	0,20	-	-	-	-
Ведра (пластик, металл)	0,20	-	-	-	-
Тележка (металл)	0,20	-	-	-	-
Аппарат для снятия пера (металл)	0,20	-	-	-	-

Примечание: (+) рост микроорганизмов имеется; (–) рост отсутствует.

Результаты опытов (табл. 4)показали, что до дезинфекции все поверхности и оборудование санбойни были сильно обсеменены микрофлорой.

После дезинфекции поверхностей направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» в дозе 0,2л/м^2 и экспозиции 6 ч (кишечная палочка, стафилококк) и 24 ч (грибы и споры) вся микрофлора была инактивирована, что свидетельствует о высокой эффективности разработанных режимов и технологии дезинфекции.

Заключение. Комиссионными опытами, проведенными на птицефабрике, установлено, что в помещениях для выращивания цыплят, убойного цеха, яйцесклада и санбойни кишечные палочки, стафилококки и грибы на поверхностях полностью инактивируются при расходе препарата «Анолит АНК Супер» 200 мл/м^2 и экспозиции 6-24 ч.

По результатам исследований для ветеринарной практики нами была разработана «Технология дезинфекции объектов ветеринарного надзора направленными аэрозолями препарата «Анолит АНК Супер» (Утв. РАН 23.11.2016г.).

На 19-й Российской агропромышленной выставке«Золотая осень-2017», проходившей в городе Москве на ВДНХ с 4 по 7 октября 2017, новая технология дезинфекции получила высокую оценку и награждена Дипломом и Золотой медалью.

Литература

Бахир В.М. Эффективность и безопасность химических средств для дезинфекции предстерилизационной очистки и стерилизации. Дезинфекционное дело.- 2003.-№1. – С. 29-36.

Билетикова Г.В., Билетиков Г.Б. Опыт использования электроактивированных растворов для дезинфекции животноводческих комплексов и лечения желудочно-кишечных заболеваний у животных. //МИС-РТ: Сборник. - 1999. - №21 .- С.110-112.

Ваннер Н.Э., Закомырдин А.А. Влажная дезинфекция поверхностей помещений Анолитом АНК. //III Международный симпозиум, Москва, 28-29 октября 2001 г. - ВНИИИМТ, 2001. – С. 330.

Ваннер Н.Э., Прокопенко А.А., Закомырдин А.А. / Разработка режимов и технологии дезинфекции инкубационного яйца препаратом нового поколения Анолитом АНК Супер // «Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», 2015. № 222 (2). С.36-39.

Дорофеев В.И., Дарьенко П.М., Лыгина Н.А. Влияние электроактивированной воды на микроорганизмы и практическое использование ее в ветеринарной медицине. Автореферат дис. Дорофеева В.И. - Ставрополь: СГСХА, с. 30.

Зиборова Е.А. Применение нейтрального анолита в комплексе ветеринарно-санитарных профилактических мероприятий против кишечных инфекций новорожденных телят.// Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности: III Международный симпозиум, Москва, 28-29 октября 2001 г. – М.: ВНИИИМТ, 2001, - С. 210.

Каврук Л.С., Зиборова Е.А. Применение Анолита АНК при кишечной инфекции.// Ветеринарный консультант. -2002. -№ 23. –С.6.

Прокопенко А.А., Ваннер Н.Э., Филипенкова Г.В. / «Технология дезинфекции инкубационных и товарных яиц Анолитом АНК Супер при заболеваниях птицы аэрогенными инфекциями» // «Наука XXI века: проблемы и перспективы»: Материалы IV Международной научно-практической конференции. – Уфа: РИО ИЦИПТ, 2016. – С.15-22.

Томилов А.П. Электрохимическая активация - новое направление прикладной электрохимии // Жизнь и безопасность. -2002. - №3. – С. 302-307.

Фисинин В.М., Филоненко В.И. Спирина С.К. Электроактивированная вода в птицеводстве.// Аграрная наука. - 1999. -№8. – С. 18-19.

УДК 619:616.98:578.825.15:615.37

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС ПРИ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Величко Г.Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, galina.velichko.68@mail.ru

ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН». 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д.24 корпус 1, тел. (495) 970-03-69

Интерфероновый статус – тест, предназначенный для оценки способности организма продуцировать ИФН в ответ на чужеродные воздействия. Он включает определение уровня ИФН в сыворотке крови, способности лейкоцитов спонтанно продуцировать ИФН, а также синтезировать под действием индукторов ИФН-α и -γ. В ветеринарии до настоящего времени этот тест не использовали. Проведенные исследования показали, что данный тест отражает состояние системы ИФН в организме здоровых, больных, клинически здоровых инфицированных вирусами ИРТ, ВД-БС телят, иммунокорректирующую активность, циркуляцию респираторных вирусов в стаде.

Ключевые слова: интерферон, интерфероновый статус, респираторные инфекции, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек.

INTERFERON STATUS IN BOVINE WITH VIRUS RESPSPIRATORY INFECTIONS

Velichko G.N.

«Federal State Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named by K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko RAS» 109428, Moscow, Russia

IFN status is test for validation of ability to produce IFN in response to agents. It includes serum IFN, spontaneous INF, IFN-α, IFN-γ. This test haven,t usedin veterinary medicine. Our experiments demonstrated that IFN status reflects condition of IFN system in health, sick, infected cattle with BHV, VD-VD, immunocorrection activity and etc.

Key words: interferon, interferon status, respiratory infections, bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea-mucosal disease

Интерферон (ИФН) был открыт Айзеком и Линденманом в 1957 году при изучении интерференции – невосприимчивости клеток, инфицированных одним вирусом к заражению другим вирусом. В результате клетки синтезируют белок (интерферон), обладающий защитной противовирусной активностью. Интерфероны – это семейство секретируемых гликопротеинов, продуцируемых большинством эукариотических клеток в ответ на различные индукторы вирусной и невирусной природы.

Механизм противовирусного действия ИФН заключается в развитии антивирусного состояния клеток, препятствующего размножению вируса, формированию вирусных частиц и дальнейшему его распространению. Клетки вырабатывают большое количество протеинкиназы, в результате фосфорилирования снижается уровень синтеза белка в клетке, активируется синтез рибонуклеазы, которая расщепляет клеточные РНК. Активация аденилатциклазы в клетке

приводит к подавлению синтеза вирусных белков, нарушению сборки и выхода вирусных частиц.

ИФН вызывает стимуляцию иммунной системы, повышая синтез молекул гистосовместимости I и II классов, таким образом, обеспечивает эффективную презентацию вирусных пептидов цитотоксическим Т-лимфоцитам и натуральным хелперам, которые, в свою очередь, выделяют цитокины, координирующие активность других клеток иммунной системы.

Классификация интерферонов, принятая ВОЗ и интерфероновым комитетом, основана на антигенных, биологических и физико-химических свойствах, видовом и клеточном происхождении интерферонов (5).

По физико-химическим свойствам интерфероны подразделяются на кислотостабильные: ИФН-α, ИФН-β и кислотолабильный – ИФН-γ (2).

В зависимости от типа клеток-продуцентов все интерфероны делятся на: α – вырабатывается лейкоцитами; β– синтезируемые фибробластами, клетками соединительной ткани; γ– продуцируемый активированными Т-лимфоцитами, макрофагами. ИФН обладают видоспецифичностью.

Многообразие физиологических функций интерферонов, важнейших факторов неспецифической резистентности, указывает на их контрольно-регулирующую роль в системе сохранения гомеостаза.

Для характеристики одного из механизмов врожденного иммунитета Соловьев В.Д. и Бектемиров Т.А. предложили тест «Интерфероновый статус», который включает в себя показатели: сывороточного ИФН, спонтанного ИФН, ИФН-α под воздействием ВБН и ИФН-γ под воздействием ФГА (3).

В данной работе представлены результаты изучения возможности применения теста ИФН-статус для характеристики инфекци-

онного процесса при вирусных респираторных инфекциях крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Животные. Клинически здоровый крупный рогатый скот в экспериментальных (6 голов) и полевых условиях (15 голов), экспериментально зараженные вирусом инфекционного ринотрахеита (ИРТ) телята (6 голов); клинически здоровые и больные телята из неблагополучного хозяйства по ИРТ и диареи - болезни слизистых оболочек (ВД-БС) в острой и хронической стадии (36 голов). В качестве иммуномодулятора использовали бетулин (1; 4).

Вирусы. Вирусы болезни Ньюкасла (ВБН), везикулярного стоматита (ВВС), ИРТ, ВД-БС.

Интерфероновый статус. Для проведения теста ИФН-статус отбирали образцы крови в пробирки с антикоагулянтом и отделяли плазму. Лейкоциты крови в концентрации 1,5 $x10^6$ клеток/мл ресуспендировали в среде RPMI с добавлением сыворотки эмбрионов коров. Для выявления спонтанного ИФН лейкоциты инкубировали при 37^0 С как без индуктора, так и в присутствии ВБН (индуктора ИФН -α) или ФГА (индуктора ИФН -γ). Образцы культуральной жидкости отбирали через 24ч для тестирования на спонтанный ИФН и ИФН -α, через 72 ч – на ИФН -γ. Образцы ИФН-α обрабатывали 1N HCl при pH 2,0 в течение 5 дней, затем доводили pH до нормального значения 1N раствором NaOH.

Уровень ИФН определяли биотестированием в культуре клеток MDBK с внесением по 100 рабочих доз индикаторного вируса ВВС. Результаты учитывали через 24, 48 и 72ч. За титр ИФН принимали последнее разведение образца, тормозящее развитие ЦПД ВВС на 50%.

Диагностика. Диагноз на вирусные респираторные инфекции ставили при помощи метода выделения возбудителя в культуре кле-

ток, детекции генома вируса ИРТ в полимеразной цепной реакции и выявления антител в реакции нейтрализации.

Результаты. У клинически здоровых неинфицированных телят, не имевших антител к вирусам ИРТ, ВД-БС все показатели ИФН-статуса были ниже выявляемого уровня. Исключение составил индукцированный вирусом ИРТ лейкоцитарный ИФН-α (таблица). В тоже время стандартный индуктор ИФН-α ВБН и вирус ВД-БС подобного действия не оказывали.

Телят в возрасте 2-3 месяца заражали интраназально вирусом ИРТ в дозе 2х6,5ТЦД $_{50}$/мл. Через сутки после заражения, и в период проявления симптомов респираторной болезни (кашель, конъюнктивит, выделения из носа, ринит, угнетение, анорексия) все показатели ИФН-статуса достоверно повышались (таблица) и практически не изменялись на протяжении всего срока наблюдения. Через 72 ч после заражения достоверно снижался уровень лейкоцитарного ИФН-α индуцированного ВБН - с 106,7 до 37,3 ед/мл.

Показатели ИФН-статуса у экспериментально зараженных телят, предварительно получавших течение 5 дней иммуномодулятор, также существенно отличались от показателей интактных животных. По сравнению с показателями у зараженных животных, не получавших препарата, уровень спонтанного ИФН достоверно увеличивался, что свидетельствовало о повышенной активности лейкоцитов. Уровень сывороточного ИФН снижался, что коррелировало с более легким течением болезни у животных этой группы.

У клинически здоровых телят в неблагополучном по ИРТ и ВД-БС хозяйстве все показатели ИФН-статуса были на низком уровне. Однако их уровень был достоверно выше, чем у интактных животных, но значительно ниже, чем у экспериментально зараженных телят в острой фазе.

В группе клинически больных телят в указанном выше хозяйстве ИФН статус существенно не отличался от регистрируемого у клинически здоровых телят, за исключением показателя ИФНγ.

Применение иммуномодулятора приводило к существенному повышению уровня ИФН-α и –γ.

Таблица. Интерфероновый статус у крупного рогатого скота при респираторных инфекциях

Показатели ИФН-статуса	Клинически здоровые (ед/мл)	Экспериментально зараженные телята (ед/мл)	Экспериментально зараженные телята + иммуномодулятор (ед/мл)	Клинически здоровые телята в условиях хозяйства неблагополучного по ИРТ, ВД-БС (ед/мл)	Клинически-больные телята в условиях хозяйства неблагополучного по ИРТ, ВД-БС (ед/мл)
Спонтанный	<2	124,1	512,2	8,0	22
Сывороточный	<2	428,3	256,0	-	-
ИФН-α	<2	106,7	128,0	16,0	24
ИФН-α ИРТ	128,0	-	-	16,0	32,0
ИФН-α ВД-БС	<2	-	-	-	-
ИФН-γ	<2	128,0	98,6	4,0	64,0

Заключение. Здоровые, свободные от ИРТ и ВД-БС телята имели показатели ИФН статуса ниже выявляемого уровня. При остром течении ИРТ эти показатели достоверно повышались и понижались под действием иммуномодулятора. В неблагополучном по ИРТ и ВД-БС стаде у клинически здоровых и больных телят эти показатели были сходными и имели сравнительно невысокий уровень, повышающийся под действием иммуномодулятора. Как показали наши исследования, тест «Интерфероновый статус» может быть дополни-

тельным критерием оценки инфекционного процесса при вирусных респираторных инфекциях.

Литература.

1. Величко Г.Н. Противовирусное и иммуномодулирующее действие бетулина при вирусных респираторных инфекциях крупного рогатого скота. М. 2008.

2. Орлова Т.Г., Щегловитова О.Н., Шуляк А.Ф., Н.Н.Крюков. Кислотостабильный и кислотолабильный интерфероны, индуцируемые вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. М. Вопросы вирусологии. 1988. №4. С. 437-440.

3. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М. Медицина. 1970. С.272

4. Щегловитова О.Н., Шуляк А.Ф., Величко Г.Н., Юров К.П. и др. Влияние бетулина на систему интерферона у крупного рогатого скота. Российский ветеринарный журнал. 2007. №1. С.31-33

5. Stewart W.E., Pickering L.A., Kronenberg L.H. Spontaneouss production of human interferon. Proc Natl Sci USA. 1980. 77 (10). P.5938-5942.

УДК 619:578.085.23.002

КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ БИОЛОГИИ

Гальнбек Т.В., кандидат биологических наук, зав. отделом клеточной биотехнологии ВИЭВ, tatyana-galnbek@yandex.ru;

Сайфутдинова З.Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии ВИЭВ; zsaifutdin@yandex.ru

Кулешов К.В., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии ВИЭВ; konstantinkul@gmail.com

Калинин А.Г., младший научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии ВИЭВ;kalinin.andrew2010@yandex.ru

Васильева А.Н., научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии ВИЭВ;

Потапова И.В., лаборантотдела клеточной биотехнологии ВИЭВ;

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» 109428, г. Москва, Рязанский проспект 24, к.1

Аннотация. В работе представлены данные по коллекциям клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных, количественный перечень клеточных культур по видам животных. Отмечены основные направления работы с культурами клеток и значимость коллекций в обеспечении работ в различных отраслях науки.

Ключевые слова: коллекция, культуры клеток, контаминанты.

CELL CULTURES COLLECTIONS AND THEIR VALUE IN VARIOUS BIOLOGY SECTORS.

Galnbek T.V., Saifutdinova Z.N., Kuleshov K.V., Kalinin A.G., Vasilyeva A.N., Potapova I.V.

The Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center - All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named K.I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko Russian Academy of Sciences» 109428, Moscow, Ryazansky Prospekt 24, building 1

Abstract. The paper presents data on collections of cell cultures of vertebrates and invertebrates, and a quantitative list of cell cultures by animal species. The main directions of work with cell cultures and the importance of collections in providing work in various branches of scientific researches are discussed.

Key words: collection, cell cultures, cell line contaminants.

Развитие наиболее перспективных фундаментальных и прикладных исследований в области биологии, медицины и сельского хозяйства, сохранение редких видов, а так же создание биомедицинских технологий, неразрывно связано с широким использованием культур клеток человека, животных и растений.

Разработка метода культивирования клеток и тканей вне организма - большое достижение биологической науки. Возможность культивирования клеток млекопитающих в искусственных условиях позволило моделировать сложные биологические процессы, происходящие в организме, а также изучать ответные реакции клеток на взаимодействия с различными патогенными факторами (3,10). Применение культуры клеток в практических и фундаментальных исследованиях характеризуется рядом преимуществ, например, клеточные культуры являются альтернативой экспериментам на животных, что

важно не только исходя из гуманных и экономических соображений, но и для проведения контролируемых экспериментов.

С помощью метода культуры тканей решаются проблемы, связанные с изучением цитотоксического действия различных групп химиотерапевтических соединений, входящих в состав большинства медицинских и иммунологических препаратов. Исследование токсичности антибактериальных или противораковых препаратов в культуре клеток позволяет проследить и определить основные механизмы гибели клеток непосредственно на клеточном и субклеточном уровнях и определить оптимальные концентрации для корректного использования в будущем. (2,4,9).

Клеточные системы широко используются для выделения, изучения вирусов, хламидий, токсоплазм как для научных целей, так и для производства вакцинных и диагностических препаратов (1). Все это можно осуществить только при условии наличия культур клеток, свободных от контаминантов, в том числе и исключения перекрестной контаминации клетками другого вида (4,5). Другой проблемой, затрудняющей оценку результатов вирусологических исследований, является контаминация культур клеток микоплазмами, вирусами и другими патогенами (6). Было показано, что микоплазмы встречаются не только в постоянных линиях клеток сельскохозяйственных животных, но часто выделяются и из коммерческой сыворотки крови (8).

Поддержание исходных клеточных свойств и контроль за их состоянием осуществляют национальные коллекции разных стран. Наиболее крупной мировой коллекцией является Американская коллекция типовых культур (ATCC). Создана европейская коллекция (ECACC). Организованы национальные коллекции клеточных культур в Германии, Англии, Японии, Италии, Франции. В России существует Всероссийская коллекция клеточных культур (РККК),

созданная в 1978 году путем организационного объединения уже имеющихся в отдельных институтах коллекций клеток человека, животных и растений. Задачей РККК стали сбор и сохранение клеточных культур и обеспечение ими научных, учебных учреждений, НИВС, биофабрик страны, что обеспечивает независимость развития отечественных биомедицинских исследований от коллекционных фондов других стран. Две специализированные коллекции- Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур с/х и промысловых животных и Специализированная коллекция постоянных линий беспозвоночных находятся в ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН и являются официальными хранилищами для депонирования новых клеточных линий и штаммов. В настоящее время в Коллекциях хранятся штаммы и постоянные линии клеток 25 видов животных (более 4000 тысяч образцов хранения). В том числе культуры клеток из органов крупного рогатого скота – 15 штаммов; овец – 4 штамма; свиньи – 16 штаммов; кролика – 7 штаммов; козы – 3 штамма; лошади – 1 штамм; сайги – 3 штамма; карликовой козы – 1 штамм; сибирского горного козерога – 2 штамма; обезьяны – 2 штамма; собаки – 1 штамм; кошки – 5 штаммов; мыши – 1 штамм; крысы – 2 штамма; сирийского хомячка – 3 штамма; насекомых – 20 штаммов; рыбы – 15 штаммов, человек – 3 штамма, а также дефектные по ферментам ТК и ГФРТ (мутантные) штаммы клеток и гибридные культуры клеток с/х животных (внутривидовые и межвидовые) – 6 штаммов. Кроме того, депонировано 9 штаммов гибридом продуцентов моноклональных антител к иммуноглобулинам с/х животных, к антигенам вирусов, микоплазм, к прионам; миелома - 1. Коллекция располагает уникальными внутривидовыми и межвидовыми гибридными культурами: гибрид «свинья (СПЭВ $ТК^-$) х лимфоциты лошади», «овца (ПО $ТК^-$) х лимфоциты кролика» и другие, а также с бета-клетками поджелудоч-

ной железы кролика – «овца (ПО ТК$^-$)-кролик»- продуцент инсулина. Ряд культур - продуценты гормонов щитовидной железы, активатора плазминогена, интерферонов.

Российские коллекции культур клеток являются одним из факторов сохранения генофонда как домашних, так и редких исчезающих видов животных.

Специализированная коллекция клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных начала организовываться профессором, доктором биологических наук Л.П. Дьяконовым с 1970 года. Уникальность коллекции состоит в том, что в ней хранятся культуры клеток, полученные из немалигнизированных (неопухолевых) органов и тканей животных, что позволяет использовать культуры клеток для цитологических, вирусологических, токсикологических исследований, производства безопасных вакцин и диагностических препаратов, применяемых в животноводстве, для генно-инженерных работ, а также для клонирования животных.

Коллекция уникальна; в ней хранится 116 линий и штаммов культур клеток, в т.ч. 96 депонировано новых штаммов и линий клеток. Клеточные культуры получены в отделе клеточной биотехнологии ВИЭВ, в ряде других институтов СССР и России. В порядке обмена получен ряд штаммов из американской коллекции типовых культур (АТСС), некоторых университетов США, Франции, Голландии, Швейцарии, Японии, Польши и др. стран. Коллекция регулярно пополняется засчет новых поступлений (депонирования) и создания перспективных новых клеточных культур, высокочувствительных к различным вирусам.

Помимо охарактеризованных клеточных линий в криобанке находится ряд моделей, которые требуют дополнительного изучения, паспортизации и включения в состав коллекций, такие как ЛГС (сви-

нья), ПЯ, ТЯ (овца), ПЛК-1, ПЛК-2, СКЛ-1, СКЛ-2 (кролик), VeroK (обезьяна, клон) и др.

Созданная доктором биологических наук В.Т. Какпаковым в 1978 году Всероссийская специализированная коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных (ВСКПЛК БП, Институт общей генетики им. Н.И Вавилова РАН) вошла в состав Российской Коллекции клеточных культур (РККК). В 2008 году ВСКПЛК БП передана в ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ).

Коллекция содержит 20 постоянных линий клеток от 8 видов беспозвоночных, из них, восемь - депонированных, четыре - объекты промышленного значения. Информация о фондах Коллекции представлена в Международном Каталоге клеточных линий Human and animal celllines catalogue, 1993 (Interlabprogect), а данные о Коллекции включены в Международную базу данных Всемирной Федерации Коллекций Культур.

В криобанк заложены новые постоянные линии эмбриональных клеток тараканов Blattellagermanica - BgE1 и BgE2 (из Франции); постоянная сублиния эмбриональных клеток дрозофилы - S3 безвирусная (исходная линия из США). Размножена и заложена культура клеток шинельной моли Sf9k на разных питательных средах.

Продолжены криогенетические исследования постоянных линий клеток дрозофилы и спермы трутней медоносной пчелы. Показано, что после хранения в криобанке (45 лет - линия клеток дрозофилы 67j25 Dm и более 20 лет - сперма трутней медоносной пчелы Apismellifera) клетки стабильно сохраняют основные генетические параметры. В криобанк включены новые образцы спермы трутней медоносной пчелы приокской породы, популяций пчел из Татарстана, Башкортостана, Тверской и Московской

областей. Всего в криобанк института заложено более 50 доз спермы трутней из этих четырех регионов России (одна доза – сперма от 10 трутней).

Культуры клеток поддерживаются в коллекциях и криобанке путем постоянного культивирования. Осуществляется разработка оптимальных методов изолирования, сохранения и стандартизации клеточных линий и штаммов. Разработаны и постоянно совершенствуются режимы криогенизации применительно к конкретным культурам, методы получения новых клеточных штаммов. Изучается стабильность культурально-морфологических, кариологических (включая определение кариотипа) и других свойств культур, в частности чувствительность к вирусам и патогенным простейшим, а так же контроль клеточных культур на возможную контаминацию микоплазмой, вирусом диареи.

Литература

1.Акиншина Г.Т. Моделирование развития облигатных внутриклеточных паразитов в клеточных культурах и цитоэкологические аспекты их взаимодействия в системе « паразит-клетка (хозяин)»в книге «Животная клетка в культуре», изд. Спутник +, Москва, 2009 г., стр. 557-595.

2.Васильев В.А., Какпаков В.Т. Клеточная тест-система для выявления качества сыворотки крови, питательных сред и продуктов пчеловодства. Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел», посвященной 50-летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. 26-27 апреля 2011 г. Москва.Стр 137-140

3.Журавлева Е.А., Гальнбек Т.В., Акиншина Г.Т. Новая культура клеток для культивирования вирусов. Труды ВИЭВ, Т.78, Стр.207-211

4.Колесникова С.Г., Дьяконов Л.П., Балашов В.П., Гальнбек Т.В. Изменение адгезивных способностей некоторых постоянных линий клеток под влиянием ряда лекарственных препаратов с антиаритмической активностью. Ж. Ветеринарная патология, №1(5), 2003 г., стр. 32-34

5.Кулешов К.В. Методические рекомендации по определению видовой принадлежности клеточных культур методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ), Москва, 2008 г., 19 стр.

6.Кулешов К.В., Гальнбек Т.В. Разработка методики идентификации и видовой дифференциации микроорганизмов рода Mycoplasma в клеточных лини-

ях с использованием полимеразной цепной реакции. Ж. Ветеринария и кормление, 2013 г., №4, стр.47-48

7.Кулешов К.В., Завьялова Е.А., Гальнбек Т.В. Видовая идентификация клеточных линий. Ж. Ветеринария и кормление, 2013 г., №4, стр. 49-50

8.ПодчерняеваР.Я., Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С. и др. Определение микоплазм и вируса бычьей диареи в коллекционных клеточных линиях. Информ. Бюлл. « Клеточные культуры» Санкт-Петербург, выпуск 27, стр. 80-88

9.Сайфутдинова З.Н., Гальнбек Т.В., Васильев В.А. Влияние продуктов пчеловодства (пыльцы, перги, маточного молочка) на рост культуры клеток позвоночных и беспозвоночных животных. Ж. Ветеринария и кормление, 2013 г., №4, стр.54-55

10.Kalinin A. The value of culturating of bee viruses in vitro. Conference papers The VIII International scientific and practical conference Innovation in agriculture. April 20-22, 2016, RF, Moscow, “Sputnik +”, pp. 82-84

УДК: 636.087.72

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ БОЛЮСОВ ДЛЯ КОРОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПОТОМСТВО

Головань В.Т., д. с.-х. н., профессор, главный научный сотрудник отдела технологии животноводства, e-mail: skniig@yandex.ru

Юрин Д.А., к. с.-х. н., ведущий научный сотрудник отдела технологии животноводства, e-mail: 4806144@mail.ru

Кучерявенко А. В., к. с.-х. н., соискатель,

e-mail: skniig@yandex.ru

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», 350055, Россия, Краснодар, пос. Знаменский, ул. Первомайская, 4, тел. 8 (861) 260-87-72

Аннотация. В статье описаны результаты применения витаминно-минеральных болюсов Минерал Плюс в кормлении стельных коров. Использование в кормлении коров витаминно-минеральных болюсов Минерал Плюс оказало положительное влияние на состояние здоровья коров и прирост живой массы полученного потомства.

Использование болюсов целесообразно с экономической точки зрения.

Ключевые слова: болюсы, кормление, коровы, живая масса, бычки.

USE OF VITAMIN-MINERAL BOLUSES FOR COWS AND THEIR IMPACT ON PROGENY

Golovan V.T., Dr. Agr. Sc., Yurin D.A., Kucheryavenko A.V.

FSBSI Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Ve-

terinary Medicine, 350055, Russia, Krasnodar, Znamensky settlement, Pervomayskaya str., 4, tel. 8 (861) 260-87-72

Abstract. In the article are given the data on the effect of using in the feeding of calver vitamin-mineral bolus Mineral Plus. The use of vitamin-mineral boluses Mineral Plus in the feeding of cows had a positive effect on the health of cows and the increase in the live weight of the obtained offspring. The use of boluses is advisable from an economic point of view.

Key words: boluses, feeding, cows, live weight, bulls.

Для обеспечения здоровья коров введение витаминно-минеральных болюсов пролонгированного действия является новым, эффективным и высокотехнологичным способом предупреждения авитаминозов, гипо- и гипермикроэлементозов коров [5].

Эффективность применения болюсов основана на комплексном и пролонгированном действии компонентов входящих в их состав. Использование препарата дает возможность быть уверенным, что корова обеспечена оптимальным физиологически обоснованным для ее здоровья количеством витаминов и минералов на период 6 месяцев. Размер и форма болюса разработаны для их легкого введения животным с помощью специального аппликатора и в некоторых случаях возможно без него. Такая форма введения препарата в рубец имеет ряд прогрессивных особенностей: болюсы, находясь в пищеварительном тракте, способны длительно рассасываться; высвобождение микроэлементов и витаминов происходит ежедневно, порционно, поступление витаминов и микроэлементов не зависит от аппетита животного, качества кормосмеси, параметров микроклимата и других внешних факторов; поступления в организм микроэлементов и витаминов через пищеварительную систему позволяет полноценно включить их в обменные процессы; дача микроэлементов и витаминов исключает человеческий фактор (нет необходимо-

сти контролировать введение микродоз в кормосмесь, равномерность размешивания) [1, 2, 6].

В результате применения болюсов нормализуется обмен веществ коров, обеспечивается насыщение организма животных полным спектром жизненно важных микроэлементов и витаминов, происходит нормализация работы щитовидной железы (синтез гормона тироксина), рождается жизнеспособный молодняк [3, 4].

Целью наших исследований являлась разработка способа стимуляции роста и развития телят с режимным использованием болюсов у стельных коров.

Методика. Исследования были проведены в ФГУП РПЗ «Красноармейский» имени А.И. Майстренко Красноармейского района Краснодарского края.

До использования болюсов для биохимического анализа были отобраны 15 проб сыворотки крови коров в различном физиологическом состоянии. В двух образцах было обнаружено повышенное содержания альбуминов, что связано с нарушением водно-солевого баланса в организме. В 100 % проб было снижено содержание глюкозы. Нарушение кальций-фосфорного соотношения выявлено в 13 пробах. Уровень кальция снижен у 10 животных. Во всех образцах снижен уровень каротина. Также обнаружены другие нарушения.

Для балансирования рациона применили минерально-витаминные болюсы Минерал Плюс голландского производства. В составе болюса содержатся: оксид меди, карбонат кальция, селен, сульфат марганца, сульфат цинка, йодат кальция, витамины А, Д3, токоферола ацетат (витамин Е), кальций, натрий, фосфор, магний.

Болюс Минерал Плюс активен в организме коров в течение 6 месяцев. Два болюса для крупного рогатого скота вводятся орально с помощью болюсного аппликатора. Для опыта были отобраны коровы

черно-пестрой породы на 5-9 месяцах стельности, разделенные на 2 группы по 12 голов в каждой.

Первая группа животных и полученных от них телят - контрольная. Коровы второй группы однократно получали болюсы Минерал Плюс. Содержание и рацион кормления коров первой и второй групп и полученных от них телят были одинаковыми, по зоотехническим нормам. Отел коров проводили в специальных денниках. Дальше вели наблюдение за коровами и телятами.

После рождения телят помещали в индивидуальные домики, после 2-месячного возраста переводили в групповые клетки по 5-6 голов в каждой. Поение животных проводилось при содержании в домиках - из ведра, в клетках – из групповых поилок. Кормление телят первой и второй группы предусматривало скармливание за 6 месяцев молока 420 кг; комбикорма 263 кг, сена 188 кг, силоса 210 кг. Таким образом, в первой и второй группах молока и других кормов в рационе использовано одинаковое количество. Комбикорм-стартер содержал в 1 кг сухого вещества обменной энергии 13,5 МДЖ/кг сухого вещества (СВ) и 240 г кг СВ сырого протеина.

Результаты исследований и их обсуждение. У бычков в ФГУП РПЗ «Красноармейский» проведено исследование живой массы с рождения до возраста 6 месяцев (табл. 1).

Таблица 1. Живая масса бычков

Показатель	Живая масса бычков, кг						
	При рождении	по месяцам жизни					
		1	2	3	4	5	6
Контрольная группа	32,5± 2,2	51,2± 2,9	70±2,9	89,7±3	108,5± 2,7	127± 3,3	147,5± 3,5
Опытная группа	29,2± 0,5	46,7± 0,6	65,9± 0,8	86,3± 1,2	109,1± 1,3	134,4± 1,6	160,9± 2,1
td опыт к контролю	-1,49	-1,53	-1,37	-1,04	0,20	2,05	3,31

У бычков, рожденных от коров, получавших болюсы Минерал Плюс, продолжительности внутриутробного развития составляла 274,7±3,6 дней, против 288,2±3,8 дней в контроле. Живая масса при рождении и в возрасте 1-4 месяца у бычков в опыте незначительно отличалась от показателей контрольной группы. Начиная с пятимесячного возраста, живая масса бычков опытной группы достоверно превысила показатели в контроле. В 5-месячном возрасте она равнялась соответственно: 134,4±1,6 кг против 127±3,3 кг ($P<0,05$), в 6 месяцев 160,9±2,1 кг против 147,5±3,5 кг ($P<0,05$). Стоимость дополнительно полученной живой массы 13,4 кг при цене 200 руб. за кг равна 2680 рублей. Стоимость 2-х использованных болюсов с затратами на введение 1300 руб. Коэффициент окупаемости болюсов приростом живой массы: 2680 руб./1300 руб. = 2,06.

Выводы. Использование в кормлении коров витаминно-минеральных болюсов Минерал Плюс оказало положительное влияние на состояние здоровья коров и прирост живой массы полученного потомства. Живая масса бычков опытной группы в 6-месячном возрасте превысила показатели в контроле на 13,4 кг. Использование болюсов целесообразно с экономической точки зрения.

Литература

1.Драчеловский О.В., Голяк М.А. Болюсы - новое слово в полноценном кормлении животных // Нива Урала. - 2016. - №4. - С. 28-29.

2.Воронов, Д.В. Новый способ профилактики дефицита микроэлементов и витаминов у высокопродуктивных коров / Д.В. Воронов, Ю.Н. Бобёр, А.В. Сенько // Наше сельское хозяйство. - 2011. - № 8. - С. 2-4.

3.Григорьев, Н.Г., Гаганов, А.П., Исаенков, Н.И. Технология применения вариабельных норм потребности крупного рогатого скота в сухом веществе, обменной энергии, сыром и переваримом протеине при разных уровнях продуктивности и качестве кормов. Практическое руководство, 2-е переработанное и дополненное издание. ВНИИК им. Вильямса. Москва, 2002 – 88 с.

4.Иванова И.Е., Волынкина М.Г. Витаминно-минеральные болюсы для профилактики нарушений обмена веществ у коров // Кормле-

ние сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. - 2014. - № 7. - С. 15-19.

5.Корочкина Е.А. Обмен веществ у высокопродуктивных коров при введении витаминно-минеральных болюсов пролонгированного действия // Генетика и разведение животных. - 2014. - № 1. - С. 29-32.

6. Романенко Л.В., Корочкина Е.А., Пристач Н.В., Баженова Н.Б. Использование витаминно-минеральных препаратов пролонгированного действия молочным коровам в период сухостоя // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2017. - № 4. - С. 56-61.

УДК 619:616.995.1

ДИНАМИКА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ФАСЦИОЛЕЗУ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ЗА ПЕРИОД ПОСЛЕДНИХ 6 ЛЕТ.

Горохов В. В., заслуженный деятель науки РФ,д.б.н., профессор, заведующий лабораторией мониторинга и профилактики паразитозов ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (gorohov@vniigis.ru)*;

Пузанова Е.В., старший научный сотрудник лаборатории мониторинга и профилактики паразитозов ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (puzanova@vniigis.ru)*;

*117218 г. Москва, ул. Б.Черемушкинская, д.28, ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, тел. +7(499)124-86-66.

Клёнова И. Ф., сотрудник департамента ветеринарии Министерства Сельского Хозяйства Российской Федерации (Innaklenowa@yandex.ru)**;

**117218,г. Москва, Орликов переулок, дом 1/11,Департамент Ветеринарии Министерства Сельского Хозяйства РФ, +7(495)607-80-00.

Исходя из данных статистики, нельзя не заметить тревожную тенденцию к уменьшению численности мелкого рогатого скота в структуре животноводческой промышленности, что говорит о существовании определенных проблем, в том числе и лимитирующее действие фасциолезной инвазии, в этой отрасли животноводства.

В статье изложены и проанализированы данные ветеринарной отчетности и мониторинга коллектива лаборатории за последние годы, характеризующие эпизоотическую обстановку по фасциолезу мелкого рогатого скота за период с 2012 по 2017 год в Российской Федерации.

Ключевые слова: фасциолез мелкого рогатого скота, эпизоотология, стационарно неблагополучный, мониторинг.

DYNAMICS OF THE EPIZOOTIC SITUATION FOR FASCIOLIASISSMALL CATTLE TO THE RUSSIAN FEDERATION FOR THE PERIOD OF THE LAST 6 YEARS.

Gorokhov V. V.,*Puzanova E.V.,*;
*117218 Moscow, B. Cheremushkinskaya str., 28,
ARSRJP - Branch of the Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterenari Medicina K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko the RAS,tel.+7(499)-124-86-66.
Klionova I. F.,**;
**107078 Moscow, Orlikov pereulok 1/11,Veterinary Department of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation, +7(495)-607-80-00.

Based on these statistics, it is impossible not to notice a worrisome trend towards the reduction in the number of small ruminants in the structure of the dairy industry, which suggests the existence of certain problems, including limiting actionfascioliasis invasion, in this branch of husbandry. The article presents the data of veterinary reporting and monitoring of laboratory staff in recent years, characterizing the epizootic situation on fascioliasis small cattle for the period from 2012 to 2017 in the Russian Federation.

Key words: fascioliasis small cattle, epizootology, permanentlyaffected, monitoring.

По данным Росстата РФ за последние 25 лет поголовье мелкого рогатого скота в России имело сначала тенденцию резкого снижение численности, в период с 1990 года с уровня 58,2 млн.голов по 1999 год до14,8 млн.голов, а в дальнейшем обнадеживающий медленный рост до 24,8 млн. голов в 2016 году (диаграмма 1).

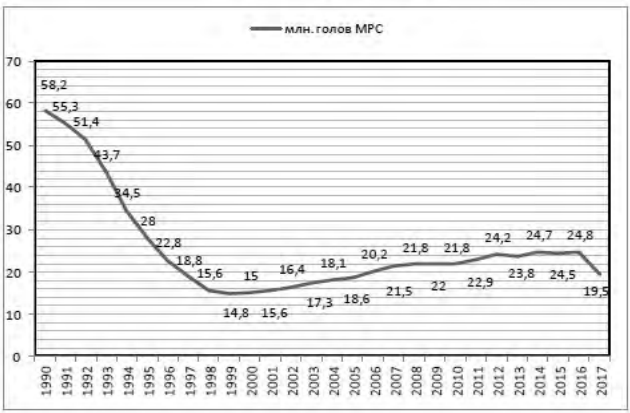
Не зависимо от форм собственности, поголовье мелкого рогатого скота в РФ представлено на 91,5% овцами и всего лишь на 8,5% козами.

В 2017 году численность мелкого рогатого скота составила 19,5 млн. голов. Данные сведения говорят о существовании определенных проблем вэтой отрасли животноводства. Одной из таких проблем остаются гельминтозные инвазии.

В данной статье мы осветим ситуацию по фасциолезу мелкого рогатого скота за последние 6 лет, как одного из важнейших гельминтозных заболеваний на сегодняшний день.

Диаграмма 1

Поголовье мелкого рогатого скота в период с 1990 по 2017 год по данным Росстата РФ



Если сравнить поголовье овец и коз по регионам нашей РФ, то можно сопоставить федеральные округа с преимущественной численностью и регионы потенциально неблагополучные в эпизоотическом отношении по фасциолезу мелкого рогатого скота (табл. 1). Наибольшее поголовье мелкого рогатого скота сосредоточено в Южном и Северо-Кавказском Федеральных округах.

За исследуемый нами период эпизоотическая ситуация по фасциолезу мелкого рогатого скота сложилась следующим образом. По отчету о заразных болезнях животных (форма 1-Вет) за 2017 год в РФ фасциолезом мелкого рогатого скота заболело в целом по стране 878голов, в 2016 году-148 головы, ранее по годам данные представлены в таблице 2 и в пересчете на 100 000 голов в том числе.

Таблица 1. Доля мелкого рогатого скота в общероссийском стаде по регионам

Регион	Доля МРС в стаде РФ	Поголовье региона, в единицах голов МРС
1.Республика Дагестан	21,2%	5183800
2.Республика Калмыкия	9,7%	2376300
3. Ставропольский край	9,1%	2230700
4. Астраханская область	6,0%	1475100
5. Карачаево-Черкессия	4,9%	1203200

Исходя из данных таблицы 2,мы отмечали следующее: резкое увеличение числа больных фасциолезом голов мелкого рогатого скота в 2013 году -1259 головы заболевших. Преимущество из данного числа,1107 голов заболевших, приходилось на Северо-Кавказский федеральный округ, все случаи зарегистрированы на территории Республики Дагестан. На втором месте по числу заболевших в 2013 году выступает Центральный округ, из общего числа 115 заболевших голов мелкого рогатого скота фасциолезом, 67 голов приходится на Калужскую область и 48 голов на Белгородскую область. На третьем месте Северо-Западный федеральный округ с числом заболевших-32 головы в Новгородской области. Данный факт резкого увеличения количества заболевших голов имеет место быть, несмотря на возросший уровень дегельминтизации в 2013 году по сравнению с предыдущими годами, как по стране, так и по отдельным округам - Северо-Кавказскому и Центральному. В 2012 году против трематодозов мелкого рогатого скота в целом по РФ была проведена дегельминтизация у 4097,151 тыс. голов, в сравнении в 2013 году у

7980,145 тыс. голов. Из них в Северо-Кавказском федеральном округе было дегельминтизировано в 2012 году-2362,638 тыс. голов, в 2013 году- 5924,492 тыс. голов. В центральном округе в 2012 году-99,924 тыс. голов, в 2013 году составило 140,722 тыс. голов.

На Северном Кавказе жизнедеятельность промежуточного хозяина фасциол, малого прудовика, начинается в конце марта, первая кладка яиц происходит в апреле. За время пастбищного периода данный моллюск делает три кладки: в апреле, конце мая- начале июня и в конце сентября. Такая интенсивная кладка в сочетании с короткими сроками созревания способствует быстрому размножению. В годы с большим количеством осадком, каким и был 2013 год, летом создаются максимально благоприятные условия для развития моллюсков. Этим, обильным спадом весенних вод и общей погодной картиной 2013 года объясняется резкое увеличение числа заболевших в этом году в Северо-Кавказском федеральном округе.

Таблица 2. Число заболевших голов мелкого рогатого скота фасциолезом в РФ по годам

	Год					
Федеральный округ	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Центральный	162	115	48	95	138	522
Северо-Западный	42	32	22	25	10	7
Южный	3	5	-	-	-	-
Северо-Кавказский	576	1107	-	-	-	-
Приволжский	-	-	-	-	-	242
Уральский	-	-	-	-	-	-
Сибирский	-	-	-	-	-	35
Дальневосточный	-	-	-	6	-	72
Всего заболевших голов в РФ	783	1259	70	126	148	878
Поголовье МРС в тыс. голов	24200	23800	24700	24500	24800	19500
На 100 000 гол. приходится заболевших	3,236	5,289	0,283	0,514	0,597	4,502

Более подробно изучить влияние погодных условий 2013 года на макологический фактор в развитии эпизоотического процесса фасциолеза мелкого рогатого скота можно по данным, предоставляемым Гидрометцентром РФ. В Центральном и Северо-Кавказском федеральных округах зима 2012-2013 год была аномально холодной, март этого года стал самым холодным в 21 веке. В Центральном федеральном округе суммы осадков за март превысили нормы в 2 раза, за несколько дней здесь выпало до полумесячной нормы осадков и более. На Юге РФ в середине месяца под снегом оказались цветущие персиковые растения.

После рекордно холодного марта почти на всей территории РФ наступил аномально теплый апрель- начало кладки яиц малым прудовиком. Средняя аномалия по всей территории достигла почти +3.В апреле на территории России осадки выпадали в достаточной мере и не превышали нормы. Умеренное количество осадков и сточных вод необходимо для создания максимальной площади водоемов с не превышающей в них глубиной выше 20 см, оптимальной для прогревания с учетом умеренного испарения. Лишь на территории гор Кавказа, в Чеченской и Ингушской республиках, суммы осадков за месяц заметно превысили нормы. Рекордно жаркий май, период второй кладки яиц малым прудовиком, в Центральном, Южном и Северо-Кавказском федеральных округах стал вторым самым теплым в истории регулярных метеонаблюдений в России,

Продолжавшиеся почти все лето дожди 2013 года привели к экстремальным паводкам и благоприятному макологическому фактору для развития фациолезной инвазии мелкого рогатого скота.

Сентябрь и осень 2013 года в России в целом стала самой холодной в 21 столетии, перейдя в исключительно теплый декабрь, тем самым в 2014 год отчеты о заболеваемости фасциолезом мелкого рогатого скота резким динамическим увеличением не отличаются.

Данные условия не способствовали выживанию большого количества моллюсков, зараженных церкариями.

Уровень диагностических исследований на трематодозы мелкого рогатого скота в данный период в РФ также не имел резких колебаний: в 2012 году- 775,212 тыс. голов, в 2013 году-757,420 тыс. голов. Что составило по годам и федеральным округам следующее: в 2012 году в Северо-Кавказском-484,941 тыс. голов, в Центральном - 13,606 тыс. голов, в 2013 году соответственно Северо-Кавказском-431,551 тыс. голов, в Центральном-11,360 тыс. голов.

В России 2017 год стал экстремально теплым, повторено достижение 2007 года. Среднегодовая температура воздуха достигла максимума. С началом календарной зимы осенние морозы усилились. В третьей декаде декабря наступило ослабление морозов. Не смотря на то, что на большей части РФ среднедекадные температуры попрежнему оставались отрицательными, на Русский Север, в Центральный регион и Верхневолжье пришло заметное потепление. В среднем за третью декаду здесь было теплее обычного на 4-11 градусов.

Сложение отрицательных и положительных аномалий привело к тому, что средняя температура декабря в Центральном, Северо-Западном и Сибирском федеральных округах была близка к норме. В это же время Южный, Северо-Кавказский, Приволжский и Уральский федеральные округа были заметно холоднее обычного, а север Дальневосточного федерального округа- теплее. Данные смены погодных условий отразились благотворно на эпизоотической ситуации по фасциолезу мелкого рогатого скота.

В 2017 году первенство по количеству заболевших фасциолезом голов мелкого рогатого скота в РФ приходилось на Центральный федеральный округ-522 головы, со следующими полученными данными по областям:167 голов – Тверская, 100 голов - Калужская область; 88 голов - Курская область,83 головы - Липецкая, 10 голов - Тульская, 3 головы - Московская область. Центральный федеральный округ отмечен за 2017 год отрицательной динамикой по сравнению с периодом 2014-2016 годов.

В Приволжском федеральном округе резкое появление - 242 головы заболевших фасциолезом мелкого рогатого скота, мы объясняем теплой февральской погодой 2017 года, сопровождавшейся обильными осадками, способствующими выживанию промежуточных хозяев фасциол- моллюсков. В Удмуртской Республике и Пермском крае нормы осадков в 2017 году были превышены в 2 раза, а в Республиках Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Башкортаста, Самарской и Ориенбургской области в 1,5 раза и более. По данным ветотчетности 230 голов мелкого рогатого скота из 242 голов приходящихся на Приволжский федеральный округ в 2017 году были зарегистрированы в Нижегородской области, и 12 из них на Республику Татарстан.

В Дальневосточном округе в 2017 году 72 головы мелкого рогатого скота, заболевшие фасциолезом, были зарегистрированы в Сахалинской области. В Сибирском федеральном округе все 35 голов приходились на Красноярский край. В то время как в Северо-Западном 7 голов мелкого рогатого скота заболевших распределились по областям следующим образом: 5- Новгородская область и 2- Вологодская область. В местах резкого повышения числа заболевших голов мелкого рогатого скота плотность популяций моллюсков колеблется от нескольких сотен до нескольких тысяч экземпляров на 1 метр квадратный.

Основными задачами в сложившейся ситуации является выявление биотопов моллюсков, обследование водоемов и пастбищ, выявление степени инвазированности прудовиков личинками фасциол. Эффективность борьбы с фасциолезной инвазией непосредственно зависит от качества выполнения профилактических мер и своевременной диагностики.

УДК 619:616.98:578.824.11:615.371

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН В 2016-2017 ГОДАХ

Л.Г. Гуламадшоева

Г.Н. Мамадатохонова

Институт проблем биологической безопасности ТАСХН, Душанбе, Республика Таджикистан

А.Н. Махмадшоев

Национальный центр ветеринарной диагностики, Душанбе, Республика Таджикистан

Аннотация. В статье приведены результаты анализа заболеваемости бешенством сельскохозяйственных, домашних и диких плотоядных животных в Таджикистане за период 2016-2017 гг. За анализируемый период случаи бешенства животных наблюдались во всех областях республики. Относительно напряженная ситуация отмечена в районах республиканского подчинения (РРП) и Хатлонской области –60 и 68 случаев соответственно.

Выявлено, что основная доля случаев бешенства в республике приходится на собак (68%). Второе место по частоте поражения вирусом бешенства занимает крупный рогатый скот (23%). Поражение других видов домашних и диких животных составило 9%.

Показано, что метод SYBR Green ПЦР в реальном времениможет успешно использоваться при эпидемиологических исследованиях для диагностики и идентификации штаммов вируса бешенства.

Ключевые слова: бешенство, собаки, крупный рогатый скот, домашние и дикие животные, сезонность.

Abstract. The results of analysis of the morbidity of rabies of agricultural, domestic, and wild carnivorous animals in Tajikistan for the 2016-2017 years are presented in this article. During the analyzed period,

the animal rabies outbreaks were observed in all regions of the country. A relatively tense situation was noted in the Districts of Republican Subordination and in the Khatlon regions – 60 and 68 cases, respectively. It was revealed that the main proportion of cases of rabies in the republic is accounted by dogs (68%). The second place in terms of the frequency of the rabies virus infection is cattle (23%). The infection of other species of domestic and wild animals was 9%. It is shown that the SYBR Green method of real-time PCR can be successfully used in epidemiological studies for the diagnostic and identificationof the rabies virus strains.

Key words: rabies, dogs, cattle, domestic and wild animals, seasonality

Бешенство одно из широко распространенных инфекционных заболеваний животных и людей в Таджикистане [1,2, 3, 4, 8, 11, 14, 15].

По оценке Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. Ежегодно свыше 15 млн. человек получают укусы и травмы от животных и 4 млн. человек – специфическую антирабическую вакцину[9,10, 12, 13].

Следует отметить, что в Таджикистане, из числа людей, обратившихся в травматические пункты за помощью, 94,5% связаны с укусами собак, 2,3% - кошек, 2,3% - укусами и травмами нанесенных грызунами [7, 9, 11, 15].

В подавляющем большинстве случаев смерти людей от бешенства источником инфекции выступают собаки, на которых приходится до 99% всех случаев передачи бешенства людям.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в сфере эпидемиологического надзора и специфической профилактики бе-

шенства животных, ежегодно в республике от болезни умирает в среднем 12 человек. Эпизоотическая ситуация по бешенству остается напряженной и на протяжении последних 27 лет не снижается число заболевания среди животных и периодически отмечается активация природных очагов бешенства [5, 16].

Нами проанализированы статистические данные Национального центра ветеринарной диагностики по результатам РИФ.

Для молекулярной детекции вируса бешенства в образцах головного мозга животных нами был применен современный метод диагностики – SYBR Green ПЦР в реальном времени.

Зарегистрированные случаи бешенства животных за 2016-2017 гг. приведены в таблице 1.

Таблица 1. Регистрация случаев бешенства животных по районам республики в 2016 и в 2017г. по результатам РИФ

№	Город\район	Годы		Всего
		2016	2017	
РРП				
1	г. Душанбе	4	4	8
2	Турсунзаде	1	0	1
3	Шахринав	1	0	1
4	Гиссар	2	4	6
5	Рудаки	4	3	7
6	Варзоб	1	0	1
7	Вахдат	6	0	6
8	Файзабад	7	2	9
9	Сангвор	2	0	2
10	Таджикабад	1	0	1
11	Рашт	8	5	13
12	Ляхш	1	1	2
13	г. Рагун	2	0	2
14	Нурабад	1	0	1
	Всего	41	19	60
Хатлонская область				
15	г. Курган - Тюбе	3	1	4
16	Джайхун	1	1	2

17	Балхи	2	0	2
18	Дусти	0	4	4
19	Бохтар	14	13	27
20	Вахш	4	3	7
21	г. Сарбанд	3	4	7
22	Шаартуз	1	0	1
23	Н. Хисрав	1	0	1
24	Хуросон	6	0	6
25	г. Нурек	2	0	2
26	Темурмалик	2	0	2
27	Фархор	1	0	1
28	Ш.Шохин	1	0	1
29	Балджувон	0	1	1
	Всего	41	27	68
Согдийская область				
30	г. Худжанд	0	1	1
31	Ашт	1	0	1
32	Девештич	1	4	5
33	Б. Гафурова	8	8	16
34	Спитамен	4	4	8
35	г. Бустон	0	2	2
	Всего	14	19	33
ГБАО				
36	г. Хорог	0	1	1
Всего по республике		96	66	162

Как видно их таблицы 1,на территории Хатлонской области и РРП в 2016г. заболело бешенством по 41 животному в Согдийской области 19 и в ГБАО всего одно животное. В 2017 году число больных животных существенно сократилось, в Хатлонской области 27 против 41 и в РРП 19 против 41 случая. В Согдийской области наоборот наблюдается тенденция увеличения заболеваемости бешенством. В ГБАО за 2 года отмечен только один случай бешенства у волка.

Результаты долевого поражения видов животных приведены на рисунке 1. Как видно из рисунка 1, от всех случаев бешенства 68%

приходится на долю собак, на крупный рогатый скот – 23% и только 9% на долю овец, домашних однокопытных и диких плотоядных животных.

Согласно данным ежегодной первичной отчетности Национального Центра ветеринарной диагностики и собственных исследований было установлено, что число неблагополучных пунктов в 2016-2017гг. по республике составило 50 пунктов, из них 31 в 2016 и 19 в 2017 году. Из общего числа неблагополучных пунктов, по 20 пунктов регистрированы в Хатлонской области и РРП, 9 в Согдийской и только один пункт в ГБАО.

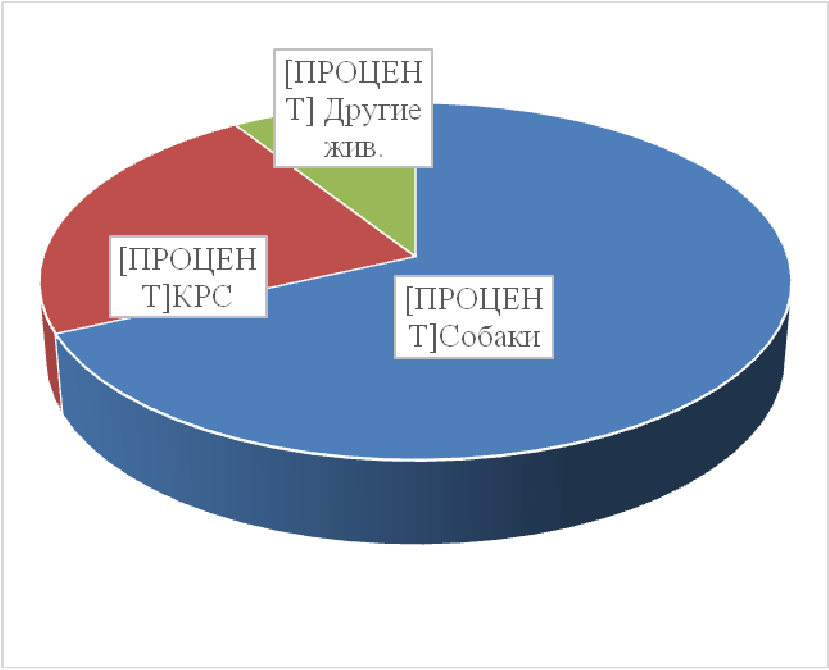


Рис. 1. Процентное отношения случаев бешенства среди различных видов животных в 2016-2017гг.

Ареал распространения бешенства в эти годы занимал территорию, затрагивающую 36 городов и районов республики (Рисунок 2).

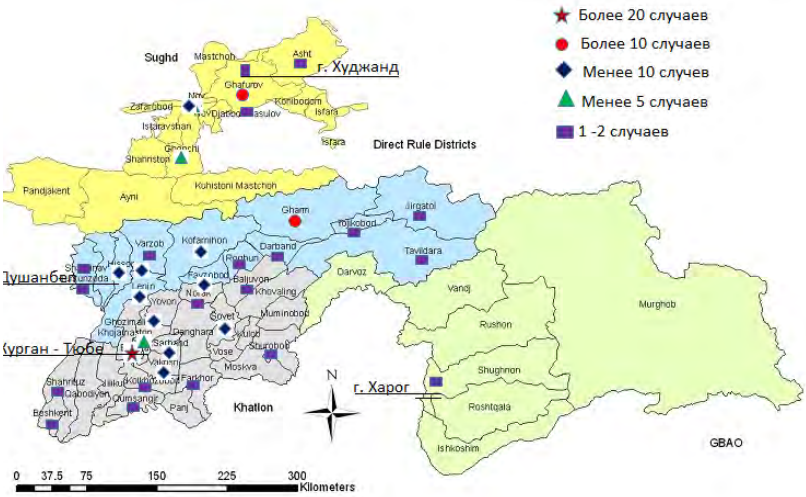


Рис. 2. Карта распределения очагов бешенства животных на территории республики в 2016 -2017гг.

Наибольшая интенсивность эпизоотического процесса регистрировалась в районах Гиссар, Рудаки, Вахдат, Файзабад и Рашт РРП, г. Душанбе, в районах Бохтар, Вахш, Сарбанд и г. Курган-Тюбе Хатлонской области, в районах Девештич, Б. Гафуров и Спитамен Согдийской области. От общего числа случаев бешенства, 80% произошли на территории этих районов.

В период 2016–2017 гг. нами были исследованы 123 образца головного мозга разных видов животных, подозрительных на бешенство с использованием SYBR Green ПЦР в реальном времени. Реагенты для реакции были любезно предоставлены Агентством ветеринарной лабораторий Вейбридж Великобритания.

РНК вируса бешенства выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy MiniKit, QIAGEN, США согласно инструкции. Реак-

ционный объем составил 20µl, а концентрация праймеров20µM на реакцию.

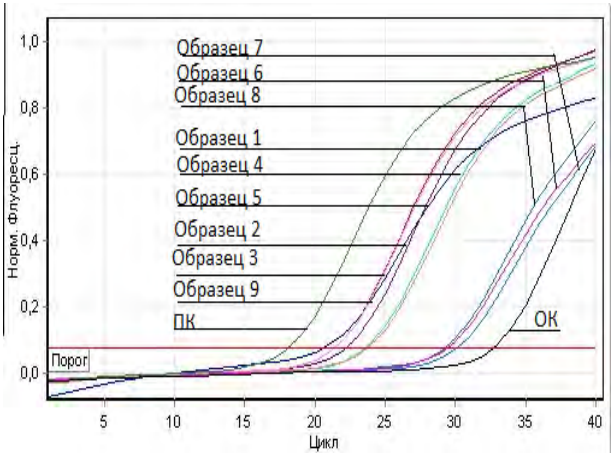
Постановка реакции была проведена согласно протоколу к диагностическому набору. Был проведен 1 цикл в режиме: 55ºС 10мин, 95ºС 5 мини 45 циклов амплификации в режиме: 95ºС- 10сек, 60º - 30сек.

Штамм CVS был использован в качестве положительного контроля и ПЦР-вода, как отрицательный контроль. ПЦР в реальном времени проводили в приборе Rotor Gene 6000 Software.

В качестве целевой последовательности выбран фрагмент консервативного N-гена, кодирующий нуклеопротеин, наиболее активно продуцируемым во время инфекционного процесса.

В работе использовали метод и праймеры разработанные и описанные Wakely P. R. и др. (6). Для амплификации продуктов в реальном времени использовали ПЦР-праймеры JW12(ATGTAACACCYCTACAATG) и N165 – 145 (GCAGGGTAYTTRTACTCATA).

Типичный график накопления продуктов амплификации и анализ кривых плавления продуктов амплификации для определения специфичности представлены на рисунках 3 и 4.



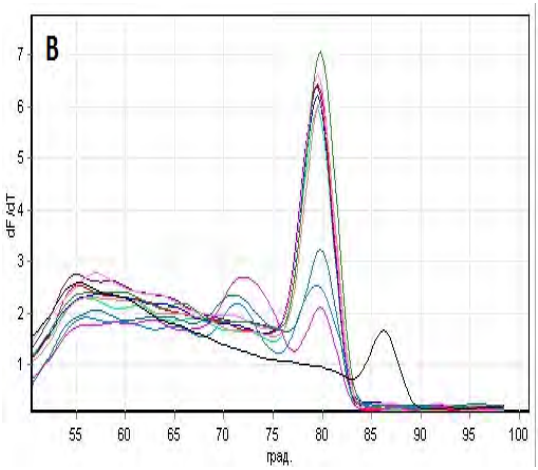


Рис.3. График накопления продуктов

Рис.4. Кривые плавления амплификации продуктов амплификации

Примечания: ПК – положительный контроль;

ОК – отрицательный контроль;

Образцы головного мозга собаки -2,5,7,8 9;

Образцы головного мозга КРС - 4, 6, 1;
Образцы - головного мозга осла -3;

Реакция происходит в две фазы. На первой фазе определяется пороговый цикл амплификации продуктов, на второй кривые плавления амплификации. Как видно из рисунка 3 на первой фазе реакции пороговый цикл (Ct) положительного контроля находится на 17-ом цикле, а отрицательного контроля на 33 цикле. Пороговый цикл всех 9 клинических образцов находится в пределах от 18 до 27 циклов, т.е. все исследуемые пробы положительны. Такая же картина наблюдалась при исследовании остальных положительных проб.

Из рисунка 4 видно, что пик плавления позитивного контроля, а также пики всех 9 образцов, которые были положительными до 27-го цикла, происходит при температуре 78°C. Анализ SYBR Green ПЦР реального времени показал, что среди 123 образцов, 91 (65,5%) были положительными. Из положительных случаев 71 приходится на долю собак, 14 - КРС, 3 - кошек, 2 - ослов и одна на долю овец.

Таким образом, метод SYBR Green ПЦР в реальном времени может успешно использоваться при эпидемиологических и эпизоотологических исследованиях для диагностики и идентификации штаммов вируса бешенства.

Литература

1.Ахмадов, Н.А. Проблемы биологической безопасности Таджикистана / Н.А. Ахмадов, М.А. Аноятбеков, О.Д. Назарова // В книге: Инновационные биотехнологии в странах Евразэс Международная научно-практическая конференция. 2012. С. 26-27.

2.Гуламадшоева Л.Г. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Республике Таджикистан в 2014–2015 годах / Л.Г.,Гуламадшоева, А.Н. Махмадшоев, М. Аноятбеков, С.А. Мурватуллоев, Г.Н. Мамадатохонова // Российский ветеринарный журнал. 2017. № 1. С. 17-19.

3.Гуламадшоева, Л.Г. Особенности молекулярно-генетической характеристики изолятов вируса бешенства в Республики Таджикистан / Л.Г. Гуламадшоева,Т.В. Гребенникова, М. Аноятбеков, А.Н. Махмадшоев, А.А, Шабейкин, И.В. Полякова, А.Г. Южаков, С.В. Лахтюхов, А.М. Гулюкин // Ветеринария и кормление. — 2016. — № 6. — С. 24-34.

4.Гулюкин, А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза / А.М Гулюкин // Вопросы вирусологии. — 2014. — Т. 59. — №3. — С. 5–10.

5.Гулюкин, А.М. Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы /А.М Гулюкин, А.А. Шабейкин, В.В. Белименко // Ветеринария. — 2016. — №7.

6.Джумаев, Ш.Н. Эпизоотическая ситуация по трансграничным болезням животных в Таджикистане / Ш.Н. Джумаев, Г.Ю. Бобоев, М.И. Косумбеков, М.А. Аноятбеков, Р.Я. Каримов // Ветеринария (Таджикистан). — 2005. — № 4. — С. 15-18.

7.Зарубин, Г.А. «О случаях нахождения вируса бешенства у лисиц в южном Таджикистане». X Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней / Изд. «Дониш» Душанбе 1979г. (9-11 октября 1979 года, г.Душанбе.) Стр. (88-89). II-книга.

8.Информационный бюллетень ВОЗ № 99 – 2015.

9.Мамадатахонова, Г.Н. Инцидентность бешенства в Центральном Таджикистане / Г.Н. Мамадатахонова, М. Аноятбеков, С.А. Мурватуллоев, Ш.А.Турдиев, А.А. Муминов //Доклады ТАСХН, — 2014.—№2(40). — С. 43-46.

10.Мурватуллоев, С.А. Эпизоотологические аспекты бешенства животных Таджикистана / С.А. Мурватуллоев, М. Аноятбеков, Г.Н. Мамадатохонова, Л.Г. Гуламадшоева, А.Н. Махмадшоев // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2016.

11.Рыбаков, С.С. Эпизоотическая ситуация по бешенству диких животных и меры его профилактики и ликвидации в государствах участниках СНГ/ С.С. Рыбаков // Ветеринария, —2005— № 1. (г. Душанбе).

12.Смирнов, А.М. Координация научных исследований по ветеринарии: новый этап и новые задачи / А.М. Смирнов, В.И. Дорожкин, А.В. Суворов, Н.К. Гуненкова, Ю.Г. Исаев // Ветеринария и кормление. — 2016. — № 1. — С. 8-10.

13.Хисматуллина, Н.А. Информационно-образовательная работа по профилактике бешенства / Н.А. Хисматуллина, Т.А. Савицкая, Г.Х. Муртазина, А.М. Гулюкин // В сборнике: «Актуальные вопросы инфектологии» Юбилейная научно-практическая конференция, посвященная 85-летию кафедры инфекционных болезней Казанского государственного медицинского университета. 2010. С. 72-73.

14.Belimenko, V.V. Prospects for the use of Geografic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans / V.V. Belimenko, A.M. Gulyukin // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. — 2016. — Т. 56. — № 8. — С. 22-25.

15.Gulyukin, A.M. The economic damage caused by Rabies of agricultural animals in Russia / A.M. Gulyukin, Y.I. Smolyaninov, A.A. Shabeykin // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. — 2016. — Т. 56. — № 8. — С. 34-38.

16.Wakely P.R. Development of Real – Time, TagMan Reverse Transcription - PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6 / Johnson N., McElhinney L.M., Marston D., Sawyer J., Fooks A.R. // Journ. ClinicalMicrobiology - 2005. -V. 43. – P. – 2786-27-92.

УДК 619: 616.995.7

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КРОВОСОСУЩИХ ДВУКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА (ОБЗОР)

Домацкий В.Н., д.б.н., гл.н.с., vniivea@mail.ru

Фёдорова О. А., к.б.н., н.с., лаборатории энтомологии и дезинсекции, fiodorova-olia@mail.ru

Сибен А.Н., к.в.н., с.н.с., лаборатории энтомозов животных, joroschewitsch@mail.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук, 625041, Российская Федерация, г. Тюмень, ул. Институтская д. 2. тел.: 8(3452)258-600; 8(3452)258-705

Аннотация: Кровососущие двукрылые насекомые, широко распространенные на территории Крайнего севера, являются переносчиками опасных заболеваний животных и человека. Особое внимание заслуживают факторы, способствующие массовому распространению заболеваний, имеющих трансмиссивный путь передачи. Особое значение в распространении болезней имеет возможность насекомых преодолевать большие расстояния. Дальность разлёта слепней, комаров и мошек может составлять десятки километров. Взаимосвязь изменений климата и расширения ареала некоторых насекомых на север в настоящее время и в ближайшей перспективе реальна и в ряде случаев отслежена. Мониторинг фауны и особенностей экологии кровососущих двукрылых насекомых се-

верных территорий в современный период необходим. Так как эти организмы в очень большой степени зависят от состояния окружающей среды и даже незначительные на первый взгляд изменения в температурном режиме и химическом составе почвы и воды, могут привести к изменению их видового состава, численности и смещению основных фенодат. В результате процессов потепления климата происходит повышение температуры воздуха, увеличение количества мест выплода, а также изменения характера водной растительности и снижения солености водоемов, что сделает их более приемлемыми для развития преимагинальных фаз развития кровососущих двукрылых насекомых.

Ключевые слова: кровососущие насекомые, разлет насекомых, изменения климата

EPIZEOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL IMPORTANCE OF BLOOD SUCKING DIPTERA INSECTS UNDER THE CONDITIONS OF THE FAR NORTH (REVIEW)

Domatsky V.N., Fiodorova O.A., Siben A.N.,

All-Russian scientific research institute of veterinary entomology and arachnology - Branch of Federal State institution Federal Research centre Tyumen Scientific Centr of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 625041, Russia, Tyumen, Institutskaya str., 2, tel.: 8(3452)258-600; 8(3452)258-705, joroschewitsch@mail.ru

Summary: Blood-sucking Diptera insects, widespread in the Far North, are carriers of dangerous diseases of animals and humans. Particular attention should be paid to the factors contributing to the mass spread of diseases with a vector-borne transmission pathway. Of particular importance in the spread of disease is the ability of insects to travel long distances. The range of blind, mosquitoes and midges can be tens of kilometers. The relationship between climate change and the expansion of some insects to the North is now and in the near future real and in some cases tracked. Monitoring of fauna and ecological features of blood-

sucking Diptera in the Northern territories is necessary in the modern period. Since these organisms are highly dependent on the environment and even seemingly insignificant changes in the temperature regime and chemical composition of soil and water, can lead to changes in their species composition, abundance and displacement of the main phenodates. As a result of the processes of climate warming, there is an increase in air temperature, an increase in the number of breeding sites, as well as changes in the nature of aquatic vegetation and a decrease in the salinity of reservoirs, which will make them more acceptable for the development ofpreimaginal phases of blood-sucking two-winged insects.

Key words: blood-sucking insects, insect dispersal, climate change

Кровососущие двукрылые насекомые, именуемые народным названием «гнус», включают в свой состав слепней (сем.Tabanidae), комаров (сем.Culicidae), мошек (сем.Simuliidae), мокрецов (сем. Ceratopogonidae). Они имеют широкое распространение на территории Крайнего севера, кроме типичной тундры. Основными факторами, определяющими высокую численность насекомых комплекса гнус, являются благоприятные климатические условия для их размножения и существования в сочетании с обилием выплода и обитания имаго, а так же присутствием достаточного количества теплокровных животных – источника насыщения кровью.

Успешное социально-экономическое развитие территорий тесно связано с сохранением эпизоотического и эпидемиологического благополучия территорий по ряду особо опасных заболеваний, имеющих широкое мировое распространение. Особое внимание заслуживают факторы, способствующие массовому распространению заболеваний, имеющих трансмиссивный (через насекомых и клещей) путь передачи.

Кровососущие насекомые являются ведущим фактором передачи возбудителя сибирской язвы в летний период - время года для их интенсивного появления. Они обусловливают также летне-осеннюю сезонность болезни. Доказано, что слепни, например, могут воспринять возбудителя сибирской язвы не только от больных жи-

вотных, но и от трупов, из инфицированных водоемов, из почвы. Состояние почвы зависит от состояния погоды, т.е. от метеорологических явлений в данное время и в данной местности. Зависимость между метеорологическими условиями и частотой случаев сибирской язвы обусловливают кровососущие насекомые (слепни).

Животные, больные сибирской язвой, являются заразными в течение всего периода болезни, выделяя возбудителя во внешнюю среду с мочой, калом, кровянистыми выделениями легких. После их гибели заразными являются все органы и ткани, в том числе шкуры, шерсть, кости, рога, копыта, кровь. [Колесов С.Г., 1976; Буравцева Н.П. Ярощук В.А. , Неляпин Н.М. и др., 1984; Ипатенко Н.Г., Седов В.А., Зелепукин В.С., Гущин В.Н.,1987] Такая высокая степень инфицированности окружающей среды позволяет насекомым быстро распространять возбудителя сибирской язвы на большие расстояния.

Помимо слепней в распространении сибирской язвы могут играть роль комары, мухи, кровососки, усиливая и дополняя роль слепней. Кровососущие двукрылые насекомые являются переносчиками возбудителей многих опасных заболеваний:

- слепни - сибирской язвы, туляремии, анаплазмоза, парафилариоза;

- комары – малярии, туляремии, сетариоза, дирофилляриоза, лихорадки Западного Нила, омской геморрагической лихорадки, многих арбовирусных инфекций;

- мошки – туляремии, сибирской язвы, анаплазмоза, онхоцеркоза и трипаносомоза птиц, симулиидотоксикоза [Колесов С.Г., 1976; Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В., 2001; Пономарев А.А., Василевич Ф.И., 2005; Домацкий В.Н., Аубакиров М.Ж., 2015]

На интенсивность эпизоотического процесса определенное воздействие оказывают температурные и другие климатические факторы. Изменение состояния региональных фаун, сопряженное со смещением границ ареаловвидов, может быть объяснено как антропогенным преобразованием ландшафтов, так и вековой динамикой регионального климата. Предполагается, что расширение ареала свя-

зано с этими двумя факторами, объединяемыми микроклиматическими условиями, соответствующими экологическому стандарту вида. Взаимосвязь изменений климата и расширения ареала некоторых насекомых на север в настоящее время и в ближайшей перспективе реальна и в ряде случаев отслежена. Насекомые получают возможность перезимовки на тех территориях, где ранее не могли пережить холодное время года.

Особое значение в распространении трансмиссивных болезней имеет возможность насекомых преодолевать большие расстояния. Дальность разлёта слепней, комаров и мошек может составлять десятки километров.

Особая опасность передачи заболевания через насекомых заключается в молниеносном распространении возбудителя по организму животного. При диагностике в полевых условиях характерная клиническая картина, позволяющая установить свойственные данному заболеванию симптомы может отсутствовать, что занимает дополнительное время на постановку диагноза и, как следствие, сокращение времени принятия оперативных решений по выявлению источника инфекции и купирования факторов его передачи.

С целью защиты животных от нападения насекомых необходимо разработать комплекс мероприятий, позволяющий эффективно контролировать численность переносчиков заболеваний.

Эффективным способом решения вопросов, связанных с реализацией в системе обеспечения эпизоотического и эпидемиологического благополучия включающего в себя проведение ежегодного мониторинга видового состава и численности насекомых-переносчиков опасных болезней.

Статья подготовлена при финансовой поддержки РФФИ , гранд №18-44-890004/18 "Современое состояние фауны паразитических насекомых Ямало-Ненецкого автономного округа и оценка численности видов - потенциальных переносчиков возбудители опасных заболеваний человека и животных ."

Литература

1. Сибирская язва/Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Владимир, 2001. 255 с.
2. Балашов Ю. С., Веселкин А. Г., Константинов С.А., Ульянов К.Н. Разлет и численность слепней рода HybomytraEnderlein (Tabanidae) вокруг стад крупного рогатого скота// Энтомол. обозр. 1985.64 (1). С. 74-78.
3.Буравцева Н.П., В.А. Ярощук, Н.М. Неляпин и др.Экспериментальная сибиреязвенная инфекция у коров // Особо опасные инфекции на Кавказе: тез.докл. V краевой науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию образования противочум. службы Кавказа. Ставрополь, 1984. С. 10–12.
4. Паразитические насекомые и клещи / Домацкий В.Н.,Аубакиров М.Ж. Костонай: Изд-во ТОО «Центрум» 2015. 257 с.
5. Иванова В.Л. Изучение территориального перемещения самок комаров рода Aedes (Díptera, Culicidae). Сообщение 2. Разлет меченых голодных самок // Мед.паразитол. 1988. №6. С. 26-31.
6. Сибирская язва сельскохозяйственных животных / ИпатенкоН.Г., Седов В.А., Зелепукин В.С., Гущин В.Н.М.: Агропромиздат, 1987. 256 с.
7. Колесов С.Г. Сибирская язва. М.: Колос, 1976. 288 с.
8. Константинов С. А. Дистанция нападения, дальность и характер суточного разлета слепней рода Hvbomitra (Diptera:Tabanidae). Паразитология. 1993. 27 (5): 419—426.
9. Лелеп П.П. К вопросу значения слепней в распространении сибирской язвы. //Сб. науч. работ Ом. НИВИ, Омск, 1936.Вып. 2.С. 70-79.
10. МедведевС.Г. Организация исследований насекомых комплекса гнуса (Diptera:Culicidae, Ceratopogonidae, Tabanidae) Ю. С. Балашовым// Паразитология, 47, 3, 2013. С. 245-260.

УДК 619:579.62:636.2.034

МОНИТОРИНГ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БОЛЕЗНЯМ РЫБ: ФАКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Завьялова Е.А., к.б.н., заведующая лабораторией ихтиопатологии, aquazeda@yandex.ru;
Дрошнев А.Е., к.б.н. в.н.с.;
Булина К.Ю., м.н.с.;
Карпова М.А., м.н.с.
Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), 109428, Россия, Москва, Рязанский проспект, д.24, к.1
(495)995-88-61

Аннотация. Проанализирована эпизоотическая ситуация по болезням рыб на территории РФ, наблюдаемая в 2015-2018 годах. Из года в год, начиная с 2006, наблюдается тенденция к увеличению доли продукции аквакультуры в России и сохранению объемов промысла в естественных водоемах.

По нашим наблюдениям, перспектива проведения предварительных и регулярных исследований основана на заинтересованности рыбоводческих хозяйств в результатах работы, которые могут снизить заболеваемость вирусными заболеваниями и тормозить развитие бактериальных заболеваний, возникающих в результате масштабирования производства рыбопродукции и/или длительного использования водных объектов.

Ключевые слова: аквакультура, болезни рыб, вирусы, бактерии, инфекционный некроз поджелудочной железы лососевых, вирусная геморрагическая септицемия, весенняя виремия карпов, фурункулёз, аэромоноз.

Monitoring of epizootic situation on fish diseases: facts and prospects

Zavyalova Elena A. Ph.D in Biology, head of laboratory of ichthyopathology; Droshnev Alexey E. Ph.D in Biology, researcher of laboratory of ichthyopathology; Bulina Kristina Y. researcher of laboratory of ichthyopathology; Carpova Marianna A. researcher of laboratory of ichthyopathology

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV)

ANNOTATION. The epizootic situation on fish diseases in the Russian Federation in 2015-2018 was analyzed. The general research methodology, methodological approaches and methods of carrying epizootic study out allow to admit the epizootic situation in the country is controlled. Since 2006 there has been a trend towards an increase in the share of aquaculture production in Russia and the conservation of fishing in natural reservoirs. According to our observations, the prospect of conducting preliminary and regular studies is based on the interest of households in the results of work that can reduce the incidence of viral diseases and inhibit the development of bacterial diseases arising from the scaling of fish production and / or long-term use of water bodies.

Key words: aquaculture, fish diseases, viruses, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), viral hemorrhagic septicemia (VHS), spring viraemia of carp virus (SVCV), furunculosis, aeromonosis.

В настоящее время мировое рыболовство подошло к точке, когда наращивать объемы вылова становится все сложнее, так как доступная база отечественного рыболовства ограничена 4,0-4,5 млн. тонн, поэтому единственным способом обеспечения продовольственной безопасности страны является аквакультура - одна из самых

быстрорастущих отраслей, производящих продукцию животного происхождения, обеспечивающая почти половину всего мирового потребления рыбы. На сегодняшний день Россия производит 0,2% мировой аквакультуры, что составляет 130-140 тыс.тонн.

Важнейший фактор повышения эффективности товарного рыбоводства – обеспечение его эпизоотического благополучия. Основными факторами, сдерживающими развитие производства, являются болезни культивируемых объектов. В рыбопромысловых водоемах влияние болезней на эффективность промысла незначительно, однако рыбы могут быть переносчиками опасных для человека возбудителей. Несмотря на то, что большинство инфекций не представляют прямой угрозы здоровью человека, они отрицательно влияют на темп роста, товарный вид и качество рыбопродукции. Распространению болезней способствует перенос патогенного начала из-за расширяющейся торговли живыми гидробионтами. При этом одна из существенных проблем отечественной акваиндустрии – дефицит рыбопосадочного материала, который рыбоводам приходится закупать в США, ЮАР или Европейских странах. В этой связи актуально проводить мониторинг эпизоотического состояния рыбоводных хозяйств и рыбопромысловых водоемов, позволяющий своевременно наметить комплекс противоэпизоотических мероприятий, направленных на уменьшение потерь рыбной продукции [1,2, 3].

В данной статье проведена оценка результатов лабораторных исследований по болезням инфекционной и инвазионной патологии с 2015 по 2018 годы. Обзор составлен на основе данных предоставленных ФГУ «Центр ветеринарии» и собственных результатов лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Следует отметить, что в предыдущие годы, в России были зарегистрированы случаи возникновения вирусных болезней рыб: вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHN) в Краснодарском крае

и в Республике Карелия, вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN) и весенней виремии карпов (SVC) в Московской области, а также вирусной геморрагической септицемии лососевых (VHS) в естественных водоемах [4,5,6,7,8].

По состоянию на начало 2018 года, в Российской Федерации на ветеринарном учете состоит 2333 рыбоводных предприятий различных форм собственности и ведомственной принадлежности и 28141 рыбопромысловых водоемов (озер, рек, водохранилищ). От специалистов ветеринарной службы субъектов РФ в адрес ФГУ «Центр ветеринарии» поступили сведения по 20 позициям: трём вирусным болезням – инфекционная анемия лососевых, вирусная геморрагическая септицемия и инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых; пяти бактериальным - аэромоноз лососевых и карповых рыб, псевдомоноз лососевых и карповых рыб, вибриоз; двум грибным – бранхиомикоз лососевых и карповых рыб; паразитозам - бранхионекроз и воспаление плавательного пузыря (ВПП) карпов, ботриоцефалез, гиродактилезы карповых и лососевых рыб, ихтиофтириоз, филометроидоз, антропогенным гельминтозам: описторхозу и дифиллоботриозу, эктопаразитарные болезни, без указания нозологии, суммируются отдельно. Остальные наименования из перечня опасных заболеваний рыб, утвержденного приказом Министра сельского хозяйства РФ от 19.12.2011 г. № 476 в официальной статистике не фигурируют.

Сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ в 2015-18 годах проводился сбор данных и анализ сведений по эпизоотической ситуации в рыбоводческих хозяйствах Российской Федерации. Проведены комплексные лабораторные исследования на вирусные, бактериальные инфекции и паразитозы рыб из 52 рыбоводческих хозяйств Ленинградской, Московской, Мурманской, Калужской, Курганской, Смоленской, Тверской, Омской, Ярославской

областей, Красноярского края, Республик Карелии, Белоруссии, Крым, а также из Армении и Финляндии. Оказана помощь в разработке планов и проведении лечебно-профилактических мероприятий и обеспечении специалистов этих хозяйств нормативными документами, инструкциями и другими материалами о современных методах и способах борьбы с болезнями рыб.

За 2015-2018 годы исследованиям было подвергнуто 10 357 экз. форели, 1354 экз. атлантического лосося, 543 экз. осетров разных видов, 242 экз. карпов, 148 экз. сигов, 21 экз. кумжи, 15 экз. канального сома и 4 толстолобика из 52 рыбоводческих хозяйств.

Случаев возникновения вирусных болезней рыб в аквакультуре в 2016-18 годах не зарегистрировано, выявленная в 2015 году вспышка инфекционной анемии лососевых (ISA) в Мурманской области вошла в статистический отчет ФГБУ «Центр Ветеринарии».

Диагностические исследования на бактериальные болезни выращиваемых лососевых в течение ряда лет выявили практически 100% контаминацию внутренних органов рыб микроорганизмами, относящихся к виду *Cytophaga psychrophila*. В ходе исследований в пресных водоемах наиболее часто выявлялись микроорганизмы *Cytophaga psychrophila, Yersinia ruckeri, Pseudomonas fluorescens, Aeromonas salmonicida, Aeromonas sobria.* В марикультуре выявлена *Moritella viscose* - возбудитель зимней язвенной болезни.

Во всех случаях обязательным являлось изучение чувствительности к антимикробным препаратам, что позволяет точно подбирать средства борьбы и контролировать развитие заболевания.

Однако, проведение массовой терапии в крупных рыбоводческих хозяйствах сильно затруднено, за счет невозможности приготовления больших количеств лечебных кормов на месте и отсутствия терапии как таковой при вирусных инфекциях, что в случае вспышки заболевания может привести к большим экономическим потерям и

наложению карантина. Поэтому, особенно перспективным можно считать контроль здоровья завозимого рыбопосадочного материала, для этого необходимо провести оценку качества молоди до завоза в хозяйство, путем комплексного обследования рыб – включая вирусологические, бактериологические и паразитологические исследования, с отбором проб на месте ее выращивания. По результатам исследования хозяйство сможет принять решение о приобретении и межрегиональной перевозке рыб.

На протяжении ряда лет сотрудники лаборатории ихтиопатологии совместно с представителями ветеринарной службы периодически выезжают в рыбоводческие хозяйства Калужской области, Республики Карелия и Белоруссии, Армении и Финляндии для проведения ихтиопатологических обследований, лабораторно-диагностических исследований и предоставления методологического сопровождения в части обеспечения ветеринарно-санитарной безопасности и предупреждения болезней рыб, что дает положительный результат.

В результате исследований установлено, что молодь форели, выращенная из оплодотворенной икры, полученной из стран импортеров – Дании (AquaSearch ApS), Франции («VIVIERS de SARRANCE», Pisciculture de Labedan) Америки (Troutlodge Inc.), ЮАР, Польши «Wylegarnia Rub Dabie» свободна от патогенов вирусной и бактериальной природы, прирост биомассы соответствует высокопородным линиям форели.

В случае выявления возбудителей болезней рекомендуется перевозку рыбопосадочного материала не производить. Так, в 2016 году при исследовании радужной форели из Армении, для проверки перед планируемым завозом в Республику Карелия, был выделен вирус-возбудитель инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHN). При исследовании радужной форели из Финлян-

дии, для проверки перед планируемым завозом в Республику Карелия, был выделен вирус-возбудитель инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN), аналогичные результаты были получены в лаборатории Агентства продовольственной безопасности Финляндской республики (EVIRA) в Хельсинки.

В обоих случаях выявления вирусов лососевых рыб Министерством сельского хозяйства Республики Карелия ввоз посадочного материала с проверенных предприятий был запрещён.

Заключение. В комплексе мероприятий по оздоровлению хозяйств от болезней рыб ведущее место принадлежит диагностике и предотвращению проникновению патогенов в районы, где его раньше не было.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг., тема (проект) №0578-2014-0025 «Мониторинг изменений эпизоотической обстановки по инфекционным болезням животных», этап «Мониторинг изменений эпизоотической обстановки по инфекционным болезням рыб» без привлечения дополнительных источников финансирования.

Литература

1.Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломыцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России (2001-2011гг). Ветеринария, №8, 2011, с.3-7.

2.Наумова А.М., Наумова А.Ю., Логинов Л.С. Эпизоотологический мониторинг рыбоводных хозяйств и рыбопромысловых водоемов России // Труды ВНИРО, 2016, т.162, с.97-102

3.Никоноров С.И., Наумова А.М., Щелкунов И.С., Головин П.П. Эпизоотологический мониторинг в аквакультуре: состояние и перспективы // Вопросы рыболовства, 2005, т.6, №4, с.797-802

4.Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е. Мониторинг в рыбоводстве //Ветеринарная жизнь. 2004. № 15 (15). С. 2.

5.Пичугина Т.Д., Завьялова Е.А., Борисова М.Н., Дьяконов Л.П., Надточей Г.А., Шуляк А.Ф. Выделение вируса инфекционного некроза поджелудочной железы // Ветеринария. 2005. № 1. С. 31-32.

6.Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Popova A.G., Oreshkova S.F., Pichugina T.D., Zavyalova E.A., Borisova M.N. First report of spring viraemia of carp virus in Moscow province, Russia // Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 2005. Т. 25. № 5. С. 203-211.

7.Пичугина Т.Д., Борисова М.Н., Завьялова Е.А., Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И. Весенняя виремия карпов // Ветеринария. 2004. № 5. С. 28-30.

8.Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Кандрина Н.Ю., Калинина Н.Р. Выделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых от рыб в естественных водоемах // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтемофауны. 2011. С. 75-77.

УДК: 619: 615:614.95

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОРБЦИОННО-ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ В ОТНОШЕНИИ РАДИОНУКЛИДОВ ^{137}Cs И ^{90}Sr ПРИ ИХ СОЧЕТАННОМ АЛИМЕНТАРНОМ ПОСТУПЛЕНИИ С ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Захарова Л.Л., доктор биол. наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник. zakharovall1951@mail.ru,

Жоров Г.А., канд. вет. наук, и.о. зав. лабораторией, geo_geo@mail.ru,

Обрывин В.Н., канд.вет.наук, научный сотрудник, tacsa@ya.ru,

Лаборатория радиобиологии. Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН»

123022, г. Москва, РФ, т. 8-499-256-35-81

Резюме. В статье представлены результаты лабораторных исследований о влиянии комплексных сорбционно-детоксицирующих средств на кумуляцию ^{137}Cs и ^{90}Sr в организме белых крыс. Проведена оценка эффективности ряда избирательных и полифункциональных сорбентов, детоксикантов и других биологически активных веществ и разрабатываемых на их основе сорбционно-детоксицирующих комплексов в качестве средств эфферентной терапии и детоксикации организма животных при сочетанном поступлении ксенобиотиков радиационной и химической природы (^{137}Cs, ^{90}Sr, Cd и Pb). Установлено, что наибольшей эффективностью в снижении накопления ^{90}Sr в костях (48,6-60,8%) обладает только комбинированное применение различных по механизму действия и химическому происхождению веществ. Наиболее высокая эффективность в

отношении ^{137}Cs (76,2 до 93,3%) наблюдалась при комбинированном применении детоксикантов, в состав которых обязательно входил ферроцианидный комплексообразующий сорбент.

Ключевые слова: радионуклиды, токсичные элементы, сорбенты, детоксиканты, белые крысы.

EFFICIENCY OF SORPTION-DETOXYSITIVE COMPLEXES IN RADIONUCLIDES ^{137}Cs AND ^{90}Sr WITH THEIR COMBINED ALIMENTARY INTAKE WITH HEAVY METALS

Zakharova L.L., zakharovall1951@mail.ru, Zhorov G.A., geo_geo@mail.ru, Obryvin V.N., tacsa@ya.ru
Laboratory of Radiobiology
All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center – K. I. Skryabin, Ya. R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences» Russian Federation 123022, Moscow, 8-499-256-35-81, vniivshe@mail.ru

The results of laboratory studies on the effect of complex sorption-detoxifying agents on the cumulation of ^{137}Cs and ^{90}Sr in the body of white rats are presented in the article. The efficiency of a number of selective and polyfunctional sorbents, detoxicants and other biologically active substances and sorption-detoxifying complexes developed on their basis as means of efferent therapy and detoxification of the animal organism at the combined intake of xenobiotics of radiation and chemical nature (^{137}Cs, ^{90}Sr, Cd and Pb) was evaluated. It was found that the greatest efficiency in reducing the accumulation of ^{90}Sr in the bones (48,6-60,8%) has only a combined use of different mechanisms of action and chemical origin of substances. The highest efficiency in respect to ^{137}Cs (76,2 to 93,3%) was observed with the combined use of detoxifiers, which necessarily included a ferrocyanide complexing sorbent.

Key words: radionuclides, toxic elements, sorbents, detoxicants, white rats.

Введение. Вопросы сочетанного действия различных вредных факторов, в том числе радиационной и химической природы, на организм млекопитающих, разработки средств и методов снижения негативного влияния экотоксикантов на животных и получения безопасной продукции остаются вплоть до настоящего времени не решенными [1, 4, 5].

Помимо хронического накопления экотоксикантов в организме животных под их влиянием развиваются различные патологии, которые сопровождаются массовым снижением общей иммунологической реактивности, угнетением активности гуморальных и клеточных механизмов естественной резистентности и другими негативными процессами, в свою очередь приводящие к росту заболеваемости животных, снижению продуктивности, качества и безопасности получаемой продукции [6]. Поэтому в системе ветеринарного обеспечения защиты здоровья животных требуется соблюдение эколого-адаптивного принципа, основанного на комбинированном применении эффективных средств детоксикации с широким спектром действия в отношении экотоксикантов химической и радиационной природы в составе сорбционно-детоксицирующих комплексов (СДК) [2-4].

Материалы и методы. Исследования проводили на беспородных белых крысах-самцах с начальной массой 200 ± 10 г, разделенных на 17 групп по 6 животных в каждой. В качестве контроля оценивали показатели накопления экотоксикантов без дачи СДК. В опытах использовали следующие концентрации экотоксикантов (на 1 кг корма): ^{90}Sr – 5000 Бк, ^{137}Cs – 1500 Бк, кадмий – 5,0 мг и свинец – 50 мг при их сочетанном присутствии в рационе.

Животные получали загрязненный радионуклидами и токсичными элементами корм и детоксицирующие и биологически активные вещества (БАВ) или их комбинации один раз в день, 6 раз в неделю, в течение 45 сут. По истечении срока эксперимента животных взвешивали, убивали и отбирали пробы костной и мышечной тканей. Определение содержания ^{137}Cs и ^{90}Sr проводили с использо-

ванием бета-гамма-спектрометрического комплекса МКГБ-01 «РАДЭК».

Результаты исследований. Результаты оценки влияния детоксицирующих препаратов и их композиций на кумуляцию в органах и тканях белых крыс ^{137}Cs (мышцы) и ^{90}Sr (кости) представлены в таблице.

Эффективность препаратов в отношении ^{137}Cs и ^{90}Sr

№ гр	Наименования исследуемых препаратов или их комбинации	Эффективность сорбции (%), M ± m	
		^{137}Cs	^{90}Sr
1	ХЖ-90	31,7 ± 5,8	40,3 ± 15,0
2	Бифеж	83,9 ± 11,2	14,3 ± 8,2
3	Цеолит	6,2 ± 1,3	29,1 ± 15,9
4	ХЖ-90 + хитозан	37,3 ± 6,4	37,3 ± 13,0
5	Бифеж + цеолит	89,5 ± 12,0	34,5 ± 10,0
6	Бифеж + хитозан	84,8 ± 9,6	37,2 ± 11,2
7	ХЖ-90 + сера	45,3 ± 5,1	59,8 ± 9,4
8	Цеолит + сера	8,8 ± 3,0	35,3 ± 8,1
9	Бифеж + цеолит + сера	89,8 ± 8,7	59,3 ± 13,6
10	Бифеж + сера + фелуцен + вермикулит + ларикарвит	76,2 ± 4,2	48,6 ± 9,8
11	Бифеж + сера + фелуцен + полисурьмин + ларикарвит	82,6 ± 8,5	55,5 ± 12,1
12	Бифеж + сера + фелуцен + вермикулит + лигногумат	82,2 ± 9,0	50,2 ± 10,8
13	Бифеж + сера + фелуцен + полисурьмин + лигногумат	81,7 ± 7,8	56,4 ± 12,1
14	Бифеж + натрия тиосульфат + фелуцен + вермикулит + полисурьмин + лигногумат	93,3 ± 5,8	47,1 ± 8,2
15	Энтеросгель + натрия тиосульфат + янтарная кислота + фелуцен	2,0 ± 1,2	60,8 ± 7,4
16	Сапропель + ферроцин + натрия тиосульфат + янтарная кислота + фелуцен	76,5 ± 9,3	60,3 ± 5,6
17	Контроль (детоксиканты отсутствуют)	–	–

Цезий-137. Комбинации детоксикантов, в составе которых отсутствовал ферроцианид-содержащий компонент (цеолит + сера, комплексы на основе энтеросгеля), проявили низкую эффективность

(2,0-8,8%), и поэтому они не могут использоваться при поступлении ^{137}Cs.

Комплексный препарат ХЖ-90, а также его композиции с серой или хитозаном, показали эффективность на уровне 31,7-45,3%, что связано с присутствием в составе ХЖ-90 10% ферроцианида, который обеспечивает проявление выраженной сорбционной способности в отношении ^{137}Cs [2].

Композиции, включающие ферроцин или бифеж, оказались наиболее эффективными (от 76,2 до 93,3%), т. е. наблюдалось снижение кумуляции ^{137}Cs в органах и тканях до 15 раз по сравнению с контролем. При этом эффективность бифежа в среднем по рецептурам была на 8,5% выше, чем ферроцина, что согласуется с данными Б.Н. Анненкова с соавт. [5].

Введение полифункциональных сорбентов (цеолит, хитозан, вермикулит, полисурьмин), серосодержащих веществ (сера, натрия тиосульфат) или БАВ (хитозан, лигногумат, фелуцен) в состав композиций в большинстве случаев повышало сорбционную активность ферроцианида на 2-10%.

Стронций-90. Как видно из таблицы, эффективность раздельного применения препаратов с целью снижения кумуляции ^{90}Sr варьировала в интервале от 14,3 до 40,3%. Однако путем подбора нескольких сорбентов, ионообменных соединений и БАВ в форме СДК можно повысить их эффективность. Например, в группе 1, получавшей комплексный препарат ХЖ-90, наблюдалась эффективность 40,3%, а в группе 7, где, кроме того же сорбента, была использована сера, эффективность возросла до 59,8%. Аналогичную закономерность можно видеть в группах 2, 5 и 9, где к бифежу добавляли цеолит, а затем серу, что повысило сорбцию с 14,3% до 59,3%.

Комбинированное введение в организм крыс нескольких

сорбентов-детоксикантов с серой, фелуценом и некоторыми другими БАВ позволяло достичь сорбционной эффективности на уровне 48,6-60,8%.

Выводы. 1. В регионах с повышенной антропогенной нагрузкой для ведения животноводства и производства экологически безопасной продукции требуется применение специальных технологий, включающих использование препаратов сорбционно-детоксицирующего действия, с целью снижения кумуляции экотоксикантов в организме сельскохозяйственных животных и сохранности их здоровья.

2. Высокоэффективными в отношении ^{137}Cs оказались композиции, состав которых включал ферроцианидный комплексообразующий сорбент, в результате чего кумуляция радионуклида в органах и тканях белых крыс снижалась на 76,2-93,3%. Присутствие в рецептурах СДК полифункциональных сорбентов, серосодержащих и других биологически активных веществ повышало сорбционную способность на 2-10%.

3. Наилучшие результаты в снижении накопления ^{90}Sr в костях (48,6-60,8%) дало одновременное применение различных по механизму действия веществ, в том числе при включении в СДК полисурьмина, вермикулита, сапропеля, энтеросгеля и цеолита. Наличие в кормах двух детоксикантов, например, при сочетании серы, полисурьмина, цеолитов или ХЖ-90 способствовало увеличению эффективности сорбции ^{90}Sr и уменьшению его кумуляции в костной ткани крыс в 1,5-2,2 раза.

Литература

1. Радиобиология. Радиационная безопасность сельскохозяйственных животных / В.А. Бударков., А.С. Зенкин, А.В. Васильев и др. Под. ред. В.А. Бударкова, А.С. Зенкина. – М.: БИБКОМ, ТРАНСЛОГ. – 2017. – 440 с.

2. Рубченков П.Н., Захарова Л.Л., Жоров Г.А. Сорбционно-детоксикационные технологии для ведения животноводства в условиях экологического неблагополучия / Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – № 3 (19). – С. 110-117.

3. Фомичев Ю.П. Сорбционно-детоксикационные технологии в животноводстве и ветеринарной медицине / Аграрная Россия. – 2004. – № 5. – С. 3-7.
4. Крюков Н.И., Бударков В.А. Сорбент экотоксикантов для применения в молочном скотоводстве / Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – №3. – С. 21-22.
5. Анненков Б.Н., Егоров А.В., Ильязов Р.Г. Радиационные аварии и ликвидация их последствий в агросфере. – Казань: ФЭН. – Академия наук РТ. – 2004. – 408 с.
6. Ежкова А.М., Яппаров А.Х., Яппаров И.А., Ежков В.О. Коррекция содержания солей тяжелых металлов бентонитами в системе «почва – растение – животное – животноводческая продукция» в регионах различной степени техногенной нагрузки. – Казань. – Центр инновационных технологий. – 2008. – 339 с.

УДК 636.52/.58.085

ФОРМИРОВАНИЕ ПРОДУКТИВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КУР-НЕСУШЕК ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОРМОВОЙ СМЕСИ НА ОСНОВЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ АНТИОКСИДАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНИЧЕСКОГО ЙОДА

Ильязов Р.Г., доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент АН РТ, r230@mail.ru [1, 2, 3]

Паштецкий А.В., кандидат экономических наук, заместитель директора по научно-организационной деятельности, pashteckiy@gmail.com [3,4]

Остапчук П.С., кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, ostapchuk_p@niishk.ru[3]

Куевда Т. А., младший научный сотрудник, green28t@yandex.ru[3]

[1] – Академия наук Республики Татарстан, 420111, РТ, г. Казань, ул. Баумана, 20.

[2] – НПЦ "Липосомальные технологии", 423600, РТ, г. Елабуга

[3] – ФГБУН «НИИСХ Крыма», 295493, РК, г. Симферополь

[4] – Никитский ботанический сад - Национальный научный центр Российской Академии наук, 298648, РК, г. Ялта, пос. Никита

Аннотация. В статье приведены результаты исследований влияния антиоксидантов в составе кормовой смеси «Полисол Омега-3» в липосомальной форме на формирование яичной продуктивности кур-несушек кросса Хайсекс белый и накопление органического йода в яйцах. Средняя масса яиц кур-несушек опытной группы увеличивается в ходе опыта с 62,5 до 65,6 г. В сумме, белок и желток у несушек

опытной группы составляет 86,0 %, а у несушек контрольной группы – на 1,6 % меньше. Содержание эритроцитов и лейкоцитов в крови кур-несушек изучаемых групп находилось в пределах физиологической нормы. Отмечается положительная тенденция накопления йода в яйцах кур опытной группы на 30-й и 40-й дни опыта, соответственно, на 76,4 и 90,3 % в сравнении с контролем.

Ключевые слова. Куры-несушки, яичная продуктивность, «Полисол омега-3», йод органический.

Summary. The results of effect of antioxidants in the composition of the “Polysol omega-3” in liposomal form on the formation of egg productivity of laying hens and the accumulation of organic iodine in eggs are stated in article. The average weight of eggs of laying hens of the experimental group increases during of the experiment from 62.5 to 65.6 g. The protein and yolk in the in the eggs of laying hens of the experimental group is 86.0% in total. The amount of protein and egg yolk of the laying hens in the control group is 1.6% less. RBC and WBC of laying hens of the study groups was within the physiological norm. The accumulation of organic iodine in laying hens’ eggs on the 30th and 40th days of the experiment by 76.4 and 90.3% respectively occurs.

Key words. laying hens, egg production, “Polysol omega-3”, organic iodine.

Постановка проблемы. В XX веке население мира увеличилось с 2 до почти 7 миллиардов человек. К 2050 году ожидается, что эта цифра увеличится еще на 2 миллиарда. В связи с чем, уровень жизни человечества должен быть поддержан производством качественных продуктов животного происхождения в глобальных масштабах. На глобальном уровне, в течение ближайших двадцати лет, производство продовольствия должно увеличиться на 50 %. Именно поэтому внедрение современных инноваций в производстве экологически чистых и высококачественных продуктов здоровыми живот-

ными важно в решении обозначенной проблемы для аграрного сектора [1].

Птицеводство, по мнению D. Pimentel и M. Pimentel [2], является наиболее щадящей аграрной культурой для окружающей среды, что важно для птицеводства Республики Крым, являющейся санаторно-курортным регионом. Таким образом, важность разработки модели получения экологически чистой продукции в отрасли принимает решающее значение.

Корма занимают наибольшую долю в структуре себестоимости птицеводства. Корм для птицы должен удовлетворять физиологические потребности максимально, что напрямую находится в зависимости от его полноценности. В стрессовые периоды отмечается повышение уровня потребления питательных веществ, которые ответственны за борьбу со стрессом [3]. Выясняется, что в условиях стресса, адаптационная особенность птицы происходит за счёт употребления ею ряда антиоксидантов, в связи с чем, возможность дополнительного обеспечения рациона птицы набором важных нутриентов может рассматриваться как один из основных элементов успешной борьбы со стресс-факторами [4].

В последнее время мировая практика свидетельствует о том, что потребители придают внимание качеству продуктов животноводства [5]. Применение антиоксидантов оказывает не только на обмен веществ в организме птицы в период выращивания, но и оказывает влияние на окисление липидов в мясе после убоя в период его хранения. [6]. При этом, многие исследования подтвердили, что чрезмерное потребление синтетических пищевых добавок связано с желудочно-кишечными, респираторными, дерматологическими и неврологическими побочными реакциями [7]. Доказана эффективность природных источников антиоксидантов в птицеводстве [8].

Таким образом, приведенный обзор научной литературы свидетельствует о высоком интересе ученых-птицеводов во всем мире к натуральным источникам антиоксидантов с целью оздоровления птицы. Установлено, что антиоксиданты в липосомальной форме могут выступить фактором, влияющим благоприятно на развитие и оздоровление организма животных и сельскохозяйственной птицы. К числу таких антиоксидантов относят бета-каротин, омега-3, органический йод в составе кормовой смеси. «Полисол Омега-3». Выбор «Полисол Омега-3» основан на том в его составе включен сбалансированный набор растительных полисахаридов и натуральных олигосахаридов, комплекс дефицитных непредельных жирных кислот, гепатопротекторы, липосомальный бета-каротин, комплекс спор бифидо- и молочнокислых бактерий, а также компоненты из питательных сред, ферментов, витаминов и минеральных солей [9]. В связи с вышеизложенным, основной целью дальнейших наших исследований является изучение влияния антиоксидантов в составе кормовой смеси «Полисол Омега-3» в липосомальной форме на развитие кур-несушек и формирование яичной продуктивности птицы.

Материал и методика исследований. Исследования были выполнены в 2018 году на базе сектора селекции сельскохозяйственных животных птицы ФГБУН «НИИСХ Крыма». Материалом для исследований служили куры-несушки кросса Хайсекс белый. Количество голов в контрольной группе – 30 голов, в опытной – 25 голов. Длительность опыта – три месяца. Изучались следующие параметры: динамика живой массы кур-несушек, формирование яичной продуктивности, накопление йода в яйцах. Биометрическая обработка результатов – по общепринятым методикам в зоотехнии.

Результаты исследований. Средняя живая масса курицнесушек в начале опыта составляла 1611,8 г – разница между исследуемыми группами незначительная – 16,1 г. При взвешивании кур-

несушек в конце первого месяца опытов, птица из контрольной группы характеризуется средней живой массой 1589,4 г, что на 55,2 г (или 3,5 %) меньше в сравнении с птицей из опытной группы. Разница не достоверная. В последующие месяцы опыта аналогичная закономерность сохраняется: второй месяц – 34 грамма, а в третий – 60 грамм. Через месяц после окончания опыта разница по живой массе незначительна и варьировала в пределах 1346 – 1344 г.

Ежедекадно взвешивали по 15 яиц от каждой группы. Средняя масса яиц кур-несушек опытной группы варьирует с 62,5 г в первую декаду до 65,6 г в конце опыта, в то время как масса яиц кур контрольной группы остается, в целом, неизменной и варьировала незначительно: средняя масса яиц отмечена 62,4 г. На заключительной декаде наблюдений разница по массе яйца у кур опытной группы является достоверной ($p \leq 0,05$) и составляет 3,5 г или 5,7 %.

К высшей категории у кур-несушек опытной группы отнесено 6,9 % яиц, в то время как у налогов контрольной группы – на 3,5 % меньше. Количество яиц отборной категории у контрольных несушек меньше в сравнении с несушками из опытной группы на 2,5 %. По количеству яиц первой категории лидируют несушки из контрольной группы – 49,5 %, в то время как у аналогов опытной группы этот показатель ниже на 4,1 %. Яйца второй категории у несушек контрольной группы составляют 3,4 %, а у несушек опытной группы на 2,0 % меньше. Яиц третьей категории не отмечено.

Ежемесячно проводился отбор яиц на предмет изучения морфологических характеристик. Массовая доля скорлупы у несушек опытной группы варьирует от 13,9 до 14,0 %, в то время как у несушек контрольной группы этот показатель принимает значение от 13,5 до 15,6 %. Массовая доля желтка у кур-несушек опытной группы варьирует в пределах 28,2 – 28,5 %, в то время как у аналогов контрольной группы этот показатель составил 27,9 – 31,2 %. Массовая

доля белка у кур-несушек опытной группы варьирует от 57,6 % в первый месяц опыта до 57,8 % в последний месяц опыта, в то время как у кур-несушек контрольной группы массовая доля белка в яйце снижается с 58,6 % в первый месяц опыта до 55,4 % в последний месяц опыта. Таким образом, в сумме, белок и желток у несушек опытной группы составляет 86,0 %, а у несушек контрольной группы – на 1,6 % меньше.

В первый месяц опыта толщина скорлупы не имеет достоверной разницы между группами и варьирует от 0,30 до 0,32 мм. Во второй месяц опыта достоверное преимущество отмечается у кур-несушек опытной группы: разница с аналогами контрольной группы составляет 0,04 мм или 14,7 % ($p \leq 0,01$). Аналогичная закономерность сохраняется и в третий месяц опыта: 0,04 мм или 13,2 % ($p \leq 0,01$)

Таблица 1. Динамика эритроцитов и лейкоцитов в крови кур-несушек кросса Хайсекс белый в опыте 2018 года.

	1 месяц		2 месяц		3 месяц	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	RBC, кл. 10^{12}/л					
$X \pm m_X$	3,22±0,08	3,62±0,10*	3,48±0,15	4,28±0,26*	3,19±0,25	3,86±0,16*
C_v, %	5,7	6,2	9,7	13,5	17,3	9,0
	WBC, кл. 10^9/л					
$X \pm m_X$	26,60±0,93	33,20±1,72*	27,60±1,29	34,60±1,72*	26,60±1,65	32,40±0,86*
C_v, %	7,8	11,6	10,4	11,1	13,8	5,9

У кур-несушек первого месяца проведения опыта разница с контрольной группой по содержанию эритроцитов отмечается на уровне 0,400 кл. 10^{12}/л или 12,4 % ($p=0,95$), а лейкоцитов – 6,600 кл. 10^9/л или 24,8 % ($p=0,95$). Во второй месяц, соответственно, 0,800 кл. 10^{12}/л или 23,0 % ($p=0,95$) и 7,00 кл. 10^9/л или 25,4 % ($p=0,95$). В третий месяц также сохраняется аналогичная тенденция ($p=0,95$): 0,674 кл. 10^{12}/л или 21,0 % и 5,80 кл. 10^9/л или 21,8 %. (таблица 1).

Увеличение потребления йода у животных увеличивает уровень содержания этого элемента в пищевых продуктах животного происхождения, что может, в итоге, способствовать профилактике

дефицита йода у человека. Отмечается положительная тенденция по содержанию йода в яйцах кур на 30-й и 40-й дни опыта, соответственно, данный показатель возрастает на 3,3 мкг (76,4 %) и 3,9 мкг (90,3 %) в сравнении с контролем. Содержание йода в яйцах кур-несушек контрольной группы составило 4,32 мкг/кг.

Выводы. Скармливание курам-несушкам антиоксидантного комплекса «Полисол Омега-3» оказывает положительное влияние на формирование яиц и накопление в них органического йода. Средняя масса яиц кур-несушек опытной группы увеличивается в ходе опыта с 62,5 до 65,6 г. В сумме, белок и желток у несушек опытной группы составляет 86,0 %, а у несушек контрольной группы – на 1,6 % меньше. Отмечается формирование утолщенной скорлупы у несушек опытной группы на 0,04 мм или 13,2 % ($p \leq 0,01$). Содержание эритроцитов и лейкоцитов в крови кур-несушек изучаемых групп находилось в пределах физиологической нормы. Отмечается положительная тенденция накопления йода в яйцах кур опытной группы на 30-й и 40-й дни опыта, соответственно, на 3,3 мкг (76,4 %) и 3,9 мкг (90,3 %) в сравнении с контролем.

Литература

1. Hartog, den L. Animal nutrition and the global developments in poultry production / L. den Hartog // Poultry Research Foundation. – 50th Anniversary Seminar. – 13th February, 2008. – Edited by Peter H. Selle. - P. 22 – 23.

2. Pimentel, D., Pimentel, M. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment / D. Pimentel, M. Pimentel // American Journal of Clinical Nutrition. – 2003. – № 78. – P. 660S - 663S.

3. Фисинин, В. Инновационные методы борьбы со стрессом в птицеводстве / В. Фисинин, Т. Папазян, П. Сурай // Птицеводство. – 2009. - № 9. – С. 10 – 14.

4. Сурай, П. Современные методы борьбы со стрессами в птицеводстве: от антиоксидантов к витагенам / П. Сурай, В.И. Фисинин // Сельскохозяйственная биология. – 2012. - № 4. – С. 3 – 13.)

5. Janssens, G. Vitamin E improves chicken meat quality / G. Janssens // Meat Process Int. Edn. Sept/Oct. – 1998. - № 42. P. 44 – 46.

6. Sebranek, J.G. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage / J.G. Sebranek, V.J.H. Sewalt, K.L. Robbins, T.A. Houser // Meat Science. – 2005. – № 69. – P. 289 – 296.

7. Guo, Q. Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage / Q. Guo, S. Gao, Y. Sun, Y.Gao, X. Wang, Z. Zhang // Industrial Crops and Products. – 2016. - № 94. – P. 82 – 88.

8. Jiang, J. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review / J. Jiang, Y.L. Xiong // Meat Science. – 2016. – № 120. – P. 107 – 117.\

9. Нанотехнологии в животноводстве. Методическое руководство по применению липосомальных форм антиоксидантов (бета-каротин, астаксатин, омега-3) и кормовых смесей на их основе для повышения молочной и мясной продуктивности, улучшения качества и здоровья сельскохозяйственных животных / Под редакцией члена-корреспондента Академии наук Республики Татарстан Ильязова Р.Г. – Казань, 2017. – 33 с.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Иматдинов А.Р., мнс отд. «Государственная коллекция микроорганизмов», almazlcf@yandex.ru,

Дубровская О.А., к.б.н., мнс отд. «Государственная коллекция микроорганизмов», olgadubrovskaya@list.ru,

Казакова А.С., к.б.н., нс лаб. «Лекарственных средств для животных», annakazakova85@gmail.com,

Сливко И.А., к.в.н., зав. лаб. «Лекарственных средств для животных», ig.sko@rambler.ru,

Середа А.Д., д.б.н., профессор, гнс лаб. «Лекарственных средств для животных», sereda-56@mail.ru.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» ул. Академика Бакулова, стр. 1, 601125, пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия, тел:+7 (492) 237-92-51

Аннотация. Представлен краткий анализ данных о разнообразии вируса африканской чумы свиней (АЧС), которое проявляется в различиях между изолятами и штаммами по патотиповой вариабельности вирулентности, количественной гемадсорбции, сероиммунотиповому плюралитету, генотипическому многообразию.

Патотиповая вариабельность вирулентности проявляется в том, что в зависимости от свойств изолята вируса, способа и дозы заражения болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. По признаку количественной гемадсорбции состав популяции каждого штамма гетерогенный, включает

зараженные *in vitro* клетки с «плотной», «промежуточной» и «рыхлой» адсорбцией эритроцитов, но в различных их пропорциях.

По данным сероиммунотипизации выделенные в различных регионах мира изоляты и штаммы разделены на 12 групп, в том числе 9 сероиммунотипов с соответствующими референс-штаммами. Альтернативная классификация изолятов и штаммов вируса – генотипирование на основании сиквенса 478-нуклеотидного фрагмента из С-терминальной части гена B646L, кодирующего капсидный белок p72. Сотни изолятов, различающихся по географическому происхождению и организму-хозяину, разделены на 23 генотипа. Однако, в результате анализа других генов, внутри одного генотипа удавалось выявлять от 12 до 19 подгрупп. Позднее было установлено, что филогенетический анализ по отдельным белкам не всегда соответствует кластеризации, наблюдаемой при сравнении конкатенированных консервативных открытых рамок считывания (open reading frame, ORF). Сформулированы предложения по разработке единой системы классификации изолятов и штаммов вируса АЧС на основе анализа генома серотипоспецифичного гемадсорбирующего белка вируса АЧС gp 110-140 (CD2v).

Ключевые слова: африканская чума свиней, гемадсорбция, вирулентность, сероиммунотипы, генотипы.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIVERSITY OF THE AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

Imatdinov A.R., Dubrovskaya O.A., Kazakova A.S., Slivko I.A., Sereda A.D.

Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center for Virology and Microbiology (FSBSI FRCVM), 601125 Volginsky, Academician Bakoulov Street, bldg. 1, Petushki area, Vladimir Region, the Russian Federation tel: +7 (492) 237-92-51

Abstract. A brief analysis of the data on the diversity of the African swine fever virus (ASF) is discussed that manifests itself in the differences in virulence pathotype variability indices, quantitative haemadsorption levels, seroimmunotype plurality and/or genotype variety as observed among the isolates and strains detected during ASF outbreaks in Africa, Europe, South America, the Caribbean and Asia.

The virulence pathotype variability is manifested in the fact that the infection can be peracute, acute, subacute, chronical or asymptomatic depending on the characteristics of the virus isolate or the route & the dose of infection. Based on the quantitative haemadsorption indices, the composition of the population of each strain is heterogeneous and includes *in vitro* infected cells exhibiting "dense", "intermediate" and/or "loose" erythrocyte adsorption levels though in various proportions.

According to the seroimmunotyping data available, the isolates and strains detected in various regions of the world are divided into 12 groups including 9 seroimmunotypes with the respective reference strains. An alternative classification of ASFV isolates & strains is genotyping based on the sequence of a 478-nucleotide fragment from the C-terminal part of gene B646L coding for the capsid protein p72. Dozens of isolates that differ in their geographic origin and/or the host organism are divided into 23 genotypes. However, analysis of other genes allowed identification of 12 to 19 variants within one genotype. Later on it was determined that the phylogenic analysis for individual proteins does not inevitably correspond to the clustering patterns as observed when comparing concatenated conserved open reading frames (ORFs).

Thus, some proposals have been formulated on the development of a unified classification system for ASFV isolates & strains to be made on the basis of the genome analysis of the ASF virus serotype-specific haemadsorbing protein gp 110-140 (CD2v).

Key words: African swine fever, haemadsorption, virulence, seroimmunotypes, genotypes.

Африканская чума свиней – вирусная, контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. Вакцины против АЧС отсутствуют. Одной из причин, препятствующих разработке вакцин, является экстремальная гетерогенность вируса АЧС, которая проявляется в различиях между изолятами и штаммами по патотиповой вариабельности вирулентности, количественной гемадсорбции, сероиммунотиповому плюралитету, генотипическому многообразию [1].

Патотиповая вариабельность вирулентности проявляется в том, что в зависимости от свойств изолятов и штаммов вируса АЧС, способа и дозы заражения болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. При острой форме болезни гибель животных наступает, как правило, на 5-14 сутки со 100 %-ным летальным исходом, при подостром – на 15-25 сутки, при этом часть животных (до 25%) может выжить, оставаясь пожизненно вирусоносителями. При хроническом течении АЧС продолжительность болезни может составлять до 2 месяцев и более с гибелью больных свиней в отдалённые сроки.

Исследования, проведенные с использованием различных штаммов вируса АЧС, показали их существенные отличия по показателям количественной гемадсорбции. Среднее арифметическое число эритроцитов на одну гемадсорбирующую клетку (моноцит/макрофаг) в оказалось различным: низким у штамма ФК-32/135 (18.52±0.36) и более высоким у штаммов Франция-32 и Киравира-67 (29.32±0.71 и 34.49±0.89). Установлено, что по показателям количественной гемадсорбции состав популяции каждого штамма гетерогенный. При микроскопии клеток зараженной первичной культуры костного мозга

свиней (КМС) одновременно в поле зрения встречаются «плотная» (41-80 эритроцитов на клетку (эр/кл), «промежуточная» (21-40 эр/кл) и «рыхлая» (1-20 эр/кл) гемадсорбция, но в различных их пропорциях. На основании исследования восьми штаммов вируса АЧС с различными биологическими свойствами был сформирован своеобразный «градиент» по степени вирулентности и гемадсорбирующей активности. Аттенуированные штаммы характеризовались присутствием только субпопуляций, имеющих «рыхлый» и «промежуточный» типы гемадсорбции. Вирулентные - содержали только субпопуляции вируса с «промежуточным» и «плотным» типами гемадсорбции. Таким образом, количественная характеристика гемадсорбирующей активности может рассматриваться как важный фенотипический признак изолятов и штаммов вируса АЧС [1].

Используя реакцию задержки гемадсорбции (РЗГАд) и иммунологическую пробу на животных, Malmquist W. (1963) показал существование семи иммунологических и серологических типов выделенных в Африке изолятов [2]. Отечественные исследователи доказали, что результаты иммунологической типизации вируса АЧС заражением свиней, предварительно «вакцинированных» аттенуированными штаммами (биопроба), как правило, совпадают с их серотиповой характеристикой в РЗГАд. Около 100 исследованных штаммов и изолятов вируса АЧС африканского, европейского и южноамериканского происхождения по данным сероиммунотипизации были разделены на 12 групп, в том числе 9 сероиммунотипов с соответствующими референс-штаммами [3]. Обоснованность сероиммунотипой классификации вируса АЧС подтверждена идентификацией серотипоспецифического мажорного гликопротеина gp110-140 вируса АЧС [4].

Действующая и широко признанная классификация изолятов и штаммов вируса АЧС основана на методе генотипирования по секве-

нированию 478-нуклеотидного фрагмента С-терминальной части гена B646L, кодирующего структурный белок p72. Проанализировав полученные в разное время десятки изолятов, различающихся по географическому происхождению и организму-хозяину, удалось выделить 23 генотипа вируса АЧС [5]. Позднее были проведены исследования, которые позволили на основании анализа центрального вариабельного участка внутри ORF гена 9RL дополнительно дифференцировать внутри I генотипа 12 различных подгрупп. На основе анализа нуклеотидной последовательности участка другого гена, B602L, 66 изолятов, относящихся к I генотипу, были разделены на 19 подгрупп [6]. Изоляты вируса АЧС, выделенные с 2007 г. по настоящее время в Европе и Азии, отнесены ко II генотипу. Сравнение нуклеотидной последовательности генома изолята Georgia 2007/1 с другими изолятами показало, что он наиболее близок к африканскому изоляту Mkuzi 1979, выделенному от клещей в ЮАР. Однако, филогенетический анализ конкатенированных белковых последовательностей из 125 консервативных ORF приводит к кластеризации изолятов Georgia 2007/1 и Mkuzi 1979 с изолятами генотипа I. Таким образом, анализ филогении по отдельным белкам не всегда соответствует кластеризации, наблюдаемой при сравнении конкатенированных консервативных ORF[6].

Ранее упоминалось, что белок gp 110-140 (или CD2v) обладает свойством серотиповой специфичности. Malogolovkin et al. (2014) установили, что филогенетическое древо, построенное на основании анализа генов белков CD2v и лектина С-типа, соответствует распределению изолятов и штаммов по сероиммунотипам [7]. Исходя из вышеизложенного, предлагается разработать единую систему классификации изолятов и штаммов вируса АЧС на основе антигенных свойств, что потребует международной кооперации в определении референс-штаммов и стандартизации методик сероиммунотипиза-

ции. Представляется целесообразным экспериментально подтвердить возможность определения сероиммунотипов изолятов вируса АЧС по гену CD2v-белка, и начать исследования по созданию экспериментальных полисероиммунотипоспецифичных рекомбинантных и ДНК-вакцин против вируса АЧС.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-316-00061.

Литература

1.Макаров В.В. Иммунологическая концепция африканской чумы свиней (некоторые итоги исследований). Ветеринарная практика, 2013, 62(3): 7 – 22.

2.Malmquist, W.A. Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. Am. J. Vet. Res., 1963, 24, 450 – 459.

3.Середа А.Д, Балышев В.М. Антигенное разнообразие вируса АЧС. Вопросы вирусологии, 2011, 4: 38 – 42.

4.Середа А.Д., Казакова А.С., Иматдинов А.Р., Колбасов Д.В. Гуморальные и клеточно-опосредованные механизмы иммунитета при африканской чуме свиней. Сельскохозяйственная биология, 2015, 50(6): 709 – 718.

5.Bastos A.D.S., Penrith M-L, Crucière C, Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., Couacy-Hymann E., Thomson G.R. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial *p72* gene characterization. Arch. Virol., 2003, 148: 693 – 706.

6.Chapman D.A.G., Darby A.C., Da Silva M., Upton C., Radford A.D., Dixon L.K. Genomic analysis of highly virulent isolate of African swine fever virus. Emerg. Infect. Dis., 2011, 17(4): 599 – 605.

7.Malogolovkin A., Burmakina G., Titov I., Sereda A., Gogin A., Baryshnikova E., Kolbasov D. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. Emerg. Infect. Dis., 2015, 21(2): 312 – 315.

УДК579.62: 577.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Molecular genetic diagnosis of brucellosis in experimentally infected animals

[1]Искандаров М.И., [1]Федоров А.И.,[1]Искандарова С.С., [1]Забережный А.Д., [1]Комина А.К., [1]Кучерук О.Д., [2]Храмов А.П., [1]Альбертян М.П.

[1]Iskandarov M.I., [1]Fedorov A.I., [1]Iskandarova S.S., [1]Zaberezhny A.D., [1]Komina A.K., [1]Kucheruk O.D.,[2]Khramov A.P.,[1]Albertyan M.P.

[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), 109428, Российская Федерация, г. Москва, Рязанский пр-т, д.24, кор.1

Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre VIEV» (FSC VIEV), Moscow, Russia,e-mail: org@viev.ru

[2]ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина

109472, Российская федерация, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

FGOU VO Moscow state Academy of veterinary medicine and biotechnology

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ биологического материала от экспериментально заражённых бруцеллёзом животных. Показана возможность применения ПЦР в комплексной диагностике бруцеллёза на основе родо-специфической идентификации возбудителей с потенциальной возможностью дифференциальной диагностики.

Ключевые слова: Бруцеллез, полимеразная цепная реакция

Abstract. A molecular analysis was conducted on animals after experimental infection with Brucellosis. It was confirmed that PCR was a useful tool in complex diagnostic analyses based on genus-specific identification of Brucella with a potential application for differential diagnostics.

Key words: Brucellosis, polymerase chain reaction.

Введение. В системе противобруцеллезных мероприятий большое значение имеет диагностика. За прошедшие годы в экспериментальных и производственных условиях было испытано большое количество диагностических средств и методов. Подробно изучены сроки развития и угасания иммунобиологических реакций и их диагностическое значение у различных видов животных [5, 3,4].

Выявление эпизоотических очагов инфекции и их локализация, оздоровление пораженных бруцеллезом хозяйств, отбор здоровых животных при пополнении или формировании новых стад, определение степени распространения инфекции и организация противобруцеллезных мероприятий могут быть разрешены только на основе полноценных методов диагностики и правильного их использования. От своевременного распознавания бруцеллеза, главным образом, зависит дальнейшая судьба стада в отношении поражения его этой инфекцией. Нередки случаи, когда при своевременном выделении больного животного прекращается дальнейшее распространение инфекции и, наоборот, несвоевременный или неправильный диагноз, особенно в случае аборта, преждевременных родов и т.п., приводит к широкому распространению бруцеллеза в стаде, и тогда ликвидация его представляет большие затруднения. В связи с этим, разработке и усовершенствованию бактериологических, серологических и аллергических, а в последнее время и молекулярно-генетических методов диагностики болезни придается большое значение.

Наиболее широко в ветеринарной практике используются серологические методы исследования на бруцеллез. В настоящее время для серологической диагностики бруцеллеза применяются реакция агглютинации (РА) в пробирках, реакция связывания комплемента (РСК), реакция длительного связывания комплемента на холоде (РДСК) с единым корпускулярным антигеном, разработанным в ВИЭВ, пластинчатая реакция агглютинации с роз бенгал антигеном (роз бенгал проба - РБП), реакция иммунодиффузии с О - полисахаридным антигеном (РИД), и в молоке коров – кольцевая реакция (КР) [8, 2, 9].

Разработаны и с положительными результатами апробированы другие методы диагностики: реакция Кумбса для определения неполных антител (РК), реакция преципитации (РП), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментный анализ (ИФА) [1].

Как правило, животных исследуют комплексно, так как ни одна из перечисленных серологических реакций, применяемая самостоятельно, не дает полноценной диагностической картины, несмотря на то, что история развития диагностических исследований знает примеры, когда каждую вновь разработанную реакцию внедряли как диагностикум, объединяющий результаты всех остальных реакций, вместе взятых. Комплексное исследование предусматривает исследование как агглютинирующих, так и комплементсвязывающих антител. Агглютинирующие антитела, представленные преимущественно IgM- классом, выявляемые в РА, РБП, ИФА появляются при бруцеллезе раньше, чем комплементсвязывающие (IgG-класс), которые выявляются в РСК или РДСК и ИФА. Как правило, показания различных реакций в различные периоды развития инфекционного или вакцинного процесса совпадают между собой от 50 до 90 и более процентов. Вместе с тем, каждая отдельная реакция позволяет до-

полнительно выявлять реагирующих животных [2,4]. По этой причине все предложенные методы диагностики применяются в комплексе, так как в связи с различной чувствительностью и специфичностью, а также стадией инфекционного процесса каждый конкретный метод в отдельности выявляет разное количество положительно реагирующих животных.

Некоторые диагностические методики, (РДСК, РИФ, ИФА, РНГА, РНАт и др.) позволяют выявлять не только антитела, но и антигены бруцелл в патматериале, а также дифференцировать реакции у больных и вакцинированных животных (РНГА, РИД).

В последнее время в ветеринарную практику внедряются молекулярно-генетические методы диагностики бруцеллеза, позволяющие выявлять ДНК бактерий в биологическом материале. Это высокочувствительные, специфичные, достаточно простые и быстрые, в плане получения результата, методы, одним из которых является ПЦР. Благодаря высокой чувствительности, специфичности и универсальности, метод ПЦР все чаще применяется для диагностики инфекционных болезней. ПЦР выявляет ДНК из патматериала, содержащего менее 100 клеток бруцелл.

В результате исследований с использованием метода ДНК-ДНК гибридизации выявлено, что бактерии рода Brucella – компактная, хорошо обособленная группа микроорганизмов. Уровень гомологии ДНК очень высокий и составляет 90-100 % независимо от степени диссоциации [6]. На основе гомологии ДНК бруцелл дискутируется предложение об объединении всех видов бруцелл в один вид B. melitensis и рассматривать их как биовары этого вида. Однако сообщается также и о различиях в профиле фрагментов ДНК у бруцелл при анализе ДНК рестрикционным методом (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ) основанный на использовании эндонуклеаз рестрикции.

Молекулярно-генетическая идентификация ДНК разных видов бруцелл, в значительной степени разрешает проблему диагностики бруцеллеза, в том числе и прижизненную.

Целью нашего исследования является выявление и идентификация возбудителей бруцеллёза в органах и тканях экспериментально зараженных животных при помощи молекулярно-биологических методов.

Материалы и методы. Исследования проводились на базе лаборатории хронических инфекций и лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН в 2017-2018 годах в рамках исполнения государственного задания № 0578-2014-0001.

Материал для исследований был собран от 4 баранов, экспериментально зараженных возбудителем бруцеллеза вида *B. Abortus* 19 из коллекции музейных штаммов бруцелл, хранящихся в блок-лаборатории № 3, Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Баранов заражали 2-суточной культурой бруцелл в дозе 80 млрд. м.к. подкожно, в бесшерстный участок за локтевым суставом. Через 45 суток провели убой, обескровливание и патологоанатомическое вскрытие. Из паренхиматозных органов (печень, селезенка) и лимфатических узлов делали бактериологические посевы и отбор проб для исследования в ПЦР. Работу с культурами бруцелл проводили в соответствии с требованиями, предъявляемыми к работе с микроорганизмами 2-й группы опасности.

Для выделения ДНК использовали коммерческий набор реагентов, основанный на методике фиксации нуклеиновой кислоты на магнитных частицах «Sileks Mag NA-G» («Sileks», Россия).

Для родоспецифичной идентификации возбудителя использовались праймеры «BrA», дифференциация *B. abortus* от других ви-

дов бруцелл осуществлялась с помощью олигонуклеотидов «BAbor», а дальнейшая идентификация штамма 19 *B. Abortus* проводилась парой праймеров «Eri» и «WboA» (табл.1).[7]

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров

Название	Последовательность 5'-3'	Длина, н	Размер ампликонап.н	Температура отжига, °С
BrA-F	AGTCAGACGTTGCCTATT	18	260	61
BrA-R	GTGTTCAGCCTTGATATG	19		61
BAbor-F	GTTCTTGCTGGTCTTGCGGTG	21	1054	60
BAbor-R	AGCGCAGGAGATGCAGGCAC	20		60
Eri-F	GCGCCGCGAAGAACTTATCAA	21	178	63
Eri-R	CGCCATGTTAGCGGCGGTGA	20		63
WboA-F	GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA	26	400	65
WboA-R	TTAAGCGCTGATGCCATTTCCTTCAC	24		65

Реакционная смесь объемом 25мкл содержала 10мкл ПЦР-буфера, 3 мММgCl, 0,2 мМdNTPs, 0,4 мкМ каждого праймера, 2,5 ед./100мкл Taq-полимеразы и 10 мкл ДНК.

ПЦР проводилась с помощью программируемого термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», Россия)по следующей программе: 95 ^{o}C - 10 сек, 61/60/63/65 ^{o}C (BrA/BAbor/Eri/WboA) - 10 сек, 72 ^{o}C - 10 сек; количество циклов - 40, с предварительной денатурацией 2 мин при 95 ^{o}C и последующей элонгацией 72 ^{o}C - 3 мин.[7]

Результат амплификации учитывали посредством горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве маркера молекулярных масс использовали «100 bp Ladder DNA Marker (100 bp-3000 bp)» («Axygene», США).

Результаты исследований. Для родоспецифичной и видовой дифференцировки *B.abortus* а также для идентификации штамма 19 *B.abortus,* были использованы праймеры, которые можно применять

при молекулярно-генетической диагностике бруцеллеза у зараженных животных.

Праймеры «BrA» (табл.1) были синтезированы на основе последовательности гена BCSP31, кодирующего поверхностный белок наружной мембраны *B.abortus* размером 31 кД. Данная последовательность является идентичной для всех видов бруцелл и поэтому, эти праймеры являются родоспецифичными. Результаты проверки эффективности праймеров BrA приведены на рисунке 1 и в таблице 2.

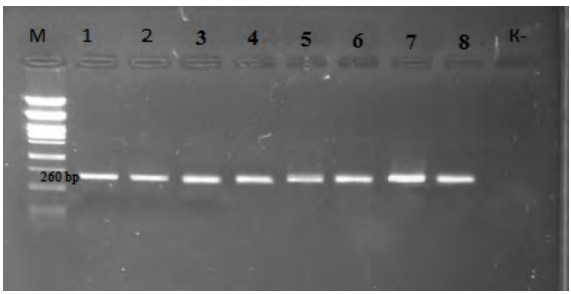


Рисунок 1. Результаты проверки эффективности праймеров BrA

Обозначения: **М**-ДНК-маркер; **1**-заглоточный правый лимфоузел; **2**-паховый левый лимфоузел; **3**-средостенный лимфоузел; **4**-печень; **5**-селезенка; **6**-*B. Abortus 19*; 7-*B. Abortus 54*; **8**-*B.melitensis H-102*; **К- -**отрицательный контроль.

Дифференциация *B. abortus* от других видов бруцелл возможна в следствие отсутствия фрагмента длиною 25 т.п.н в хромосомной ДНК всех биоваров *B. abortus*. Для постановки ПЦР были использованы олигонуклеотиды «BAbor» (табл. 1), гибридизующиеся в процессе отжига с участками ДНК, фланкирующими область размером 25 т.п.н., присутствующую у всех видов бруцелл, за исключением *B. abortus*. Таким образом, для *B. Abortus* амплифицировался фрагмент размером 1054 п.н., а для остальных видов бруцелл, амплификация не происходила, т.к. расчетный размер фрагмента очень велик (26

т.п.н.) [7].На рисунке 2 и в таблице 2 приведены результаты постановки ПЦР с праймерами BrA.

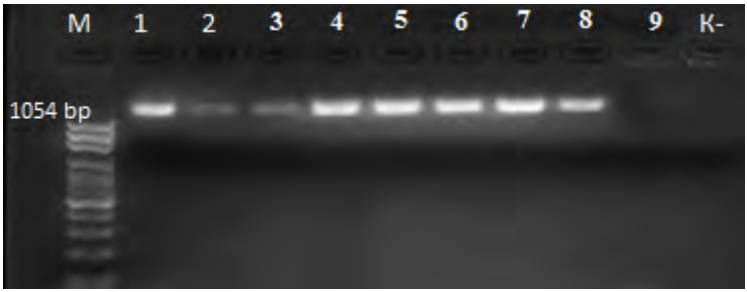


Рисунок 2. Результаты проверки эффективности праймеров BAbor

Обозначения: **М-**ДНК-маркер; **1-**заглоточный правый лимфоузел; **2-**паховый левый лимфоузел; **3-** средостенный лимфоузел; **4-** печень; **5-**селезенка; **6-***B. abortus19*; 7-*B. abortus54*; **8-** подколенный правый лимфоузел; **9-***B.melitensisH-102*; **К- -**отрицательный контроль.

Идентификация штамма 19 *B. Abortus* основана на факте отсутствия фрагмента длиной 702 п.н. в районе локуса *Eri*. Поэтому олигонуклеотиды подбирались таким образом, чтобы один из них отжигался в области локуса *Eri*, общего для штамма 19 и штаммов бруцелл вида *abortus* и других видов, тогда как другой отжигался в области гена, которая отсутствует у штамма 19. В качестве контроля параллельно проводилась ПЦР с праймерами «WboA», синтезированных на основе последовательности гена *WboA*, кодирующего гликозилтрансферазу (фермент, необходимый для биосинтеза О-антигена) [7]. Характеристики и последовательности праймеров приведены в табл.1. Результаты проверки эффективности праймеров Wbo A и Eri приведены на рисунке 3 и в таблице 2.

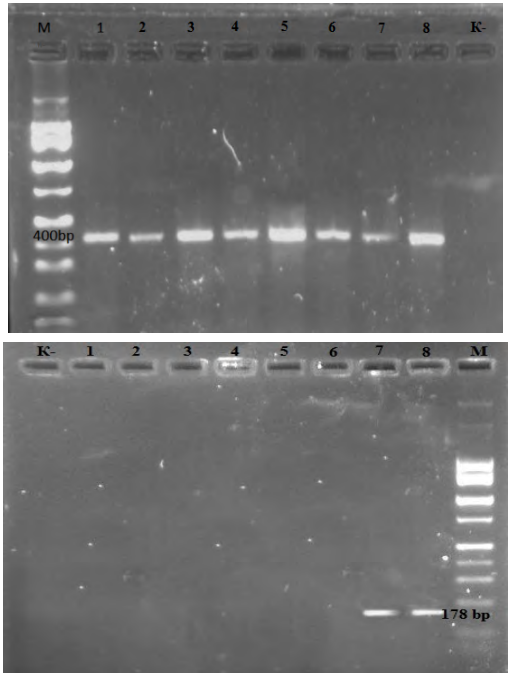


Рисунок 3. Результаты проверки эффективности праймеров WboA (слева) и Eri (справа)

Обозначения: **M-**ДНК-маркер; **1-**заглоточный правый лимфоузел; **2-**паховый левый лимфоузел; **3-** средостенный лимфоузел; **4-** печень; **5-**селезенка; **6-***B. abortus19*; 7-*B. abortus54*; **8-** *B.melitensis H-102*; **K- -**отрицательный контроль.

Из результатов ПЦР представленных в табл. 2, видно, что данные праймеры позволяют дифференцировать *B.abortus* на родовом и видовом уровнях, а также идентифицировать штамм 19 *B. abortus.*

Таблица 2. Результаты постановки ПЦР с праймерами BrA, BAbor, WboA, Eri. (количество положительных проб/общее количество проб)

Материал	Праймеры			
	BrA	BAbor	WboA	Eri
Заглоточный правый лимфоузел	4/4	4/4	4/4	0/4
Заглоточный левый лимфоузел	4/4	4/4	4/4	0/4
Паховый правый лимфоузел	4/4	3/4	4/4	0/4
Паховый левый лимфоузел	4/4	4/4	4/4	0/4
Подколенный правый лимфоузел	4/4	4/4	4/4	0/4
Подколенный левый лимфоузел	4/4	3/4	4/4	0/4
Средостенный лимфоузел	4/4	4/4	4/4	0/4
Парааортальный правый лимфоузел	3/3	3/3	3/3	0/3
Парааортальныйлевый лимфоузел	3/3	3/3	3/3	0/3
Предлопаточный левый лимфоузел	4/4	4/4	4/4	0/4
Селезенка	4/4	4/4	4/4	0/4
Почки	4/4	4/4	4/4	0/4
Печень	4/4	4/4	4/4	0/4
Суспензия бруцелл*B. abortus 19*	+	+	+	-
Суспензия бруцелл*B. abortus 54*	+	+	+	+
Суспензия бруцелл*B. melitensisH-102*	+	-	+	+

Заключение. При экспериментальном заражении животных ПЦР уверено выявляет нуклеиновые кислоты бруцелл в органах и тканях, и может применяться в качестве подтверждающего метода при диагностике бруцеллеза. Проведено выявление и видовая идентификация штамма 19 *B. Abortus* в органах экспериментально заражённых животных. В дальнейшем планируется расширить данные эксперименты при заражении животных различными штаммами бруцелл из коллекции ВИЭВ.

Литература

1.Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С. Определение иммуногенности противобруцеллезных вакцин в реакции непрямой гемагглютинации // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2016. Т. 79. С. 45-54.

2.Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Коломыцев С.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных в Российской Федерации // Ветеринария. 2013. № 6. С. 23-28.

3.Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И. История вакцинопрофилактики бруцеллеза крупного рогатого скота в России // Ветеринария и кормление. 2014. № 5. С. 50-52.

4.Искандаров М.И., Федоров А.И., Альбертян М.П. Диагностика бруцеллеза // Животноводство России. -2007. -№ 5. С. 59-60.

5.Касьянов А.Н., Маматова З.Б., Ромахов В.А., Лим А.А. Выявление антител в крови иммунизированных против бруцеллеза телок. // Ветеринария. – 1986. - №7. – С.29-31.

6.Коромыслов Г.Ф., Артюшин С.К. Исследование нуклеиновых кислот бруцелл. Достигнутые результаты и перспективы// Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации мед.помощи больным: Тез. Докл. Всесоюзн. конф., Новосибирск, 24-25 окт., 1989, - М., 1989. С. 68-70.

7.Скляров О. Д. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бруцеллеза и капмилобактериоза: диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук М– 2006

8.Чекишев В.М., Файзрахманов Ш.Р., Киселев Е.А. и др. Дифференциация вакцинированных и больных бруцеллезом животных. // Ветеринария. – 1993. - № 8. – С.25-29.

9.Albertian M.P., Fedorov A.I., Iskandarov M.I. Brucellosis vaccines: past, present and future. // Российскийветеринарныйжурнал. Сельскохозяйственные животные. -2006. № 4. -С. 8-11.

УДК 619:636.2

ВЫЯВЛЕНИЕ UREAPLASMA DIVERSUM В ОБРАЗЦАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Козлова А.Д., к.б.н., н.с.,

Горбачева Н.С., м.н.с,

Бирюкова А.Ю. с.н.с.,

Хаерова Р.Ф., специалист,

Яцентюк С.П.*, к.б.н., заведующий отделом диагностики инфекционных болезней животных

*E-mail: pcr-lab@vgnki.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ ВГНКИ), 123022, Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, Россия, тел. (499) 941-01-51

Ureaplasma diversum патоген, широко распространный во всем мире, ассоциированный с различными репродуктивными нарушениями крупного рогатого скота. Важной задачей является выявление данного патогена в рутинной лабораторной практике.

Разработана методика для выявления *U. diversum* на основе метода ПЦР в «реальном времени» в различном биологическом материале. Чувствительность методики составила $3,45x10^3$ коп/мл для спермы, молока, влагалищных смывов и внутренних органов.

ДНК *U. diversum* обнаружена в 72% влагалищных смывов, 59,7% образцов отечественной спермы, и в 12% проб импортной спермы исследованных в нашей лаборатории.

Ключевые слова: *Ureaplasma diversum,* полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме «реального времени», сперма, влагалищные смывы

DETECTION OF UREAPLASMA DIVERSUM IN BIOLOGICAL SAMPLES OF CATTLE BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION.

Kozlova A.D., Gorbacheva N.S., Biryukova A.Y., Khayerova R.F., Yatsentyuk S.P.* *E-mail: pcr-lab@vgnki.ru

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 123022, Zvenigorodskoe shosse, 5, Moscow, Russia

Ureaplasma diversum is worldwide distributed and associated with various reproductive disorders in cattle. The identification of this pathogen is very important for routine veterinary laboratory practice. Real-time PCR assay for the detection of *U. diversum* in different biological samples was developed. The sensitivity of the method was $3.45x10^3$ kop / ml for sperm, milk, vaginal washing and internal organs. *U. diversum* DNA was detected in 72% of cattle vaginal swabs and in 59,7% of frozen semen straws of Russian origin and 12% of imported semen samples

Key words: *Ureaplasma diversum*, real time polymerase chain reaction (PCR), cattle semen, vaginal swabs.

Ureaplasma diversum, представитель семейства *Mycoplasmataceae*, считается нормальным представителем микрофлоры нижнего полового тракта коров [7], но при определенных условиях данная уреаплазма может быть ассоциирована с гранулярным вульвовагинитом, эндометритом, сальпингитом, ранней эмбриональной смертностью, снижением уровня воспроизводства коров, баланопоститами, нарушением сперматогенеза и везикулитом у быков [2, 1].

Выделение. *U. diversum* от больных животных происходит с молоком, мочой, влагалищными выделениями и т.д. Также есть данные о передаче микроорганизма как при естественном, так и при искусственном осеменении зараженной спермой [6]. Поэтому важной

задачей является исследование спермы перед осеменением. Поскольку метод ПЦР является более быстрым и чувствительным, по сравнению с культуральным, целью нашей работы была разработка методики выявления *U. diversum* в клинических образцах (сперма, влагалищные смывы, молоко) на основе ПЦР в «реальном времени».

Материалы и методы. В работе использовали штаммы микоплазм и гетерологичных бактерий и вирусов, вызывающих заболевания крупного рогатого скота, молоко, влагалищные смывы, образцы криоконсервированной спермы для искусственного осеменения крупного рогатого скота (КРС) из отечественных и зарубежных племенных хозяйств.

Выделение ДНК проводили набором «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ). Амплификацию проводили на приборах с флуоресцентным методом детекции в режиме «реального времени» Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) и CFX (Bio-Rad, США). Результаты амплификации в «реальном времени» интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Положительные образцы подтверждали секвенированием ПЦР-фрагментов по Сэнгеру с использованием набора Big Dye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit на амплификаторе GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystem, США) и автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение. В результате анализа нуклеотидных последовательностей представленных в базе данных GenBank с помощью программного обеспечения VectorNTI Advanced 11.0 («InforMax, Inc.», США) были выбраны олигонуклеотидные праймеры и ДНК-зонды для амплификации участка генома 16S рРНК для *U. diversum* (Таблица 1).

Таблица 1. Праймеры и зонды для амплификации и детекции *U.diversum*

№	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Ген-мишень
1	Udv_F	5'- CATTTACTTGCATGAGTGAATG -3'	16S rRNA
2	Udv_R	5'- AGCTACGCGTCAATGAC -3'	
3	Udv_F_ROX	5'- ROX - TGGATGAGGGTGCGACG-TATCATCC - BHQ-3'	

Специфичность олигонуклеотидов была изучена с помощью интернет-сервиса Nucleotide BLAST online. В результате этой работы показана гомология выбранных олигонуклеотидов со специфическими мишенями и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других видов *Mollicutes*, а также каких-либо других вирусов, бактерий или эукариот. Экспериментально специфичность олигонуклеотидов проверяли, используя образцы геномной ДНК коровы, штаммы микоплазм и гетерологичные штаммы вирусов и бактерий, вызывающих заболевания КРС. Ни в одном случае неспецифической амплификации выявлено не было.

Для контроля выполнения всех этапов ПЦР-исследования в образцы на этапе экстракции ДНК вносили экзогенный неконкурентный Внутренний Контрольный Образец (ВКО). Анализировали амплификацию серии десятикратных разведений ПКО с концентрацией от $3{,}45x10^5$ до $3{,}45x10^2$ копий/мл в отрицательных образцах спермы, молока, влагалищных смывов и суспензии внутренних органов КРС. Абсолютную чувствительность праймеров и эффективность ПЦР оценивали по результатам амплификации разведений ПКО в 0,9% растворе натрия хлорида. Эксперимент проводили в разные дни, разными исполнителями и на разных приборах. Эффективность ПЦР определяли автоматически с помощью программного обеспечения амплификаторов Rotor Gene Q.

Чувствительность разработанной методики составила $3{,}45x10^3$ коп/мл, эффективность амплификации – 98%.

Разработанная методика была использована для выявления ДНК *U. diversum* в 44 образцах влагалищных смывов от коров и 410 образцах криоконсервированной спермы из отечественных и зарубежных племеннных центров. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Выявление *U.diversum* в клиническом материале от КРС

	Всего исследовано	Обнаружена ДНК *U.diversum*
Влагалищные смывы	44	32 (72%)
Сперма из отечественных племенных хозяйств	211	126 (59.7%)
Сперма из зарубежных племенных хозяйств	199	24 (12%)

Согласно данным 2013-2014 года, при изучении коров в Бразилии *U. diversum* выявляли в 38- 46,42% исследованных проб [3, 4]. В нашей работе во влагалищных смывах ДНК *U.diversum* была обнаружена в 32 образцах из 44, что составило 72% исследованных проб, что говорит о достаточно высоком уровне распространения данного патогена на территории страны.

Согласно последним исследованиям, связь между выявлением *U. diversum* в образцах влагалищных смывов от коров и развитием заболеваний не всегда четко прослеживается, так некоторые стада с высоким уровнем заражения *U. diversum* поддерживают нормальный коэффициент воспроизводства [4]. Тем не менее, в исследовании 2014 года было показано, что *U. diversum* чаще выявлялась в молочных стадах с репродуктивными нарушениями или низким коэффициентом воспроизводства [3]. Возможно, это связано с наличием как патогенных, так и непатогенных штаммов *U. diversum* [8].

По данным 2013 года [5] в сперме для искусственного осеменения *U. diversum* обнаруживалась в 48,6% проб. При исследовании образцов криоконсервированной спермы в нашей лаборатории ДНК *U. diversum* была выявлена в 150 пробах, что составляет 36,5% иссле-

дованных образцов. Причем в сперме быков из отечественных племенных хозяйств данный возбудитель обнаруживался почти в пять раз чаще, чем в сперме из зарубежных племенных центров. Так в образцах криоконсервированной спермы племенных хозяйств России *U. diversum* была выявлена почти в 60% случаях. В то время как в импортной сперме ДНК патогена была обнаружена только в 12% проб.

На основании проведенных исследований можно сказать, что *U. diversum* является широко распространенным патогеном на территории нашей страны. Необходимо внедрение метода ПЦР в рутинную лабораторную практику.

Литература

1.Doig P.A., Ruhnke H.L., Palmer N.C. Experimental bovine genital ureaplasmosis. II: granular vulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation. *Can J Comp Med.* 1980. (44), p259–266.

2.Doig P.A., Ruhnke H.L., Waelchli-Suter R., Palmer N.C., Miller R.B. The role of *Ureaplasma* infection in bovine reproductive disease. *Compend Contin Educ.* 1981. (3), p.324–330.

3.Gaeti J.G., Lana M.V., Silva G.S., Lerner L., de Campos C.G., Haruni F., Colodel E.M., Costa E.F., Corbellini L.G., Nakazato L., Pescador C.A. *Ureaplasma diversum* as cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil Trop. *Anim Health Prod*. 2014. 46(6), p.1059-1063

4.Marques L.M., Amorim A.T., Martins H.B.,Rezende I.S., Barbosa M.S., Lobão T.N., Campos G.B., Timenetsky J. *Vet Microbiol* 2013. 167(3-4), p.670-674.

5.Marques L.M., Buzinhani M., Neto R.L., Oliveira R.C., Yamaguti M., Guimarães A,M, Timenetsky J. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination *Vet Rec.* 2009. 165(19), p.572-573.

6.Miller R., Chelmonska-Soyta A, Smits B, Foster R, Rosendal S. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1994. 10(3), p.479-490.

7.Sanderson M.W., Chenoweth P.J., Yeary T., Nietfeld J.C. Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. *Theriogenology.* 2000. (54), p.401–408.

8.Smith A., Chousalkar K.K., Chenoweth P.C. Polymerase chain reaction for detection of Ureaplasma diversum from urogenital swabs in cattle in Australia Aust Vet J. 2012. 90(7), p.275-276.

УДК 619:616-07; 577.21

БАЗА ДАННЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Козырева Н.Г., Иванова Л.А.

кандидаты биологических наук, ведущие научный сотрудник лаборатории лейкозологии, e-mail: nk07-73@mail.ru

ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия, 109428

Резюме. На основании результатов филогенетического анализа *env, pol* генов вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) охарактеризована база данных ВИЭВ (БД ВИЭВ), в частности, обработаны массивы генетической информации, данных по животным, проведено наполнение информацией и формирование основных объектов БД. По обследованным регионам установлено распределение 5 генотипов вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) – *IG,IIG,IVG,VIIG,VIIIG* с доминирующим *IVG* вариантом; выявлены внутригрупповые эволюционные расстояния по генотипам ВЛКРС. Степень внутригрупповой дивергенции между исследуемыми изолятами из БД ВИЭВ и некоторыми референтными последовательностями из БД *GenBank* по гену *env* находится в диапазоне от 0,005 до 0,012 в зависимости от генетического варианта ВЛКРС; по гену *pol* – в среднем 0,022. В международный генетический банк депонировано 86 нуклеотидных последовательностей.

Ключевые слова: крупный рогатый скот (КРС), вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ.

THE DATA BANK OF NUCLEOTIDE SEQUENCES OF BLV ISOLATES

Kozyreva N.G., Ivanova L.A.

Summary. Based on the results of the phylogenetic analysis of env, pol genes of BLV in cattle from different farms in regions of the Russian Federation, the arrays of genetic information, data on animals were processed. The database was filled with information. The main database objects were formed. Conducted phylogenetic analysis based on the env gene made it possible to evaluate the heterogeneity and based on the pol gene allowed to estimate the homogeneity of the studied BLV population. According to the surveyed regions, the distribution of 5 genotypes of BLV - IG, IIG, IVG, VIIG, VIIIG - with the dominant IVG variant was established. The degree of intragroup divergence for the env gene is in the range from 0.005 to 0.012, depending on the genetic variant of BLV, for the pol gene - an average of 0.022. 86 nucleotide sequences were deposited in the international genetic bank GenBank.

Key words: cattle, bovine leukaemia virus (BLV), PCR, sequence analysis, phylogenetic analysis.

Введение. ВЛКРС является представителем дельтаретровирусов (наряду с Т-лимфотропными вирусами приматов (*PTLV*) – человека и обезьян (*HTLV и STLV*) [10]) семейства *Retroviridae* и индуцирует злокачественное лимфопролиферативное заболевание – энзоотический лейкоз – медленную ретровирусную инфекцию, широко распространенную по всему миру.

Для молекулярно-эпизоотологического анализа исследуются генетические последовательности области поверхностного гликопротеида *gp*51 ВЛКРС, что связано со значительной изменчивостью этого участка генома вируса. На сегодняшний день в мире выявлено 10 генетических вариантов ВЛКРС на основе гена *env* [10].

Ген *pol* является наиболее консервативным участком в составе генома ВЛКРС**.** Результаты наших экспериментов показали, что вариабельность изученного ранее целевого участка гена *pol* ВЛКРС не превышала 3% [4].

В современной ситуации внедрения инновационных компьютерных технологий в рамках компьютерной геномики для более быстрого и точного анализа большого объема генетических данных при проведении молекулярно-генетического мониторинга индуцированной ВЛКРС инфекции; установления источника инфекции при экспортно-импортных операциях важное значение приобретает анализ генетического разнообразия популяции ВЛКРС, циркулирующей на территории РФ с последующим выявлением родственных связей между различными вариантами возбудителя и создание БД охарактеризованных последовательностей изолятов возбудителя [1,2,3,4,5].

С одной стороны, генетический полиморфизм может оказать влияние на результат исследований в обоих случаях: как непрямой серологической (РДП, ИФА), так и прямой молекулярной (ПЦР) диагностики [7,9]. С другой стороны, по сравнению с лентивирусами человека и животных, генетическая вариабельность дельтаретровирусов выражена в меньшей степени [8].

Объектом исследования является генетическая информация - нуклеотидные последовательности изолятов ВЛКРС.

Цели работы: наполнение, формирование, анализ собственной БД ВИЭВ по нуклеотидным последовательностям изолятов ВЛКРС.

Материалы и методы. Работа с генетической информацией проводилась с помощью программы *BioEdit* v.7, алгоритмов сервиса *BLAST*, филогенетический анализ выполняли с помощью программы *Mega* 5.

Для статистической обработки данных, формирования БД использовали алгоритмы компьютерного приложения *Microsoft Office Excel* 2003.

Дендрограммы построены дистанционными методом присоединения соседей *NJ* (*neighbor-joining method; Saitou, Nei*, 1987) с использованием модели *p*-дистанций. Статистическую достоверность топологии деревьев оценивали с помощью метода бутстрэп-анализа при количестве случайных выборок 1000.

Для сравнения использованы нуклеотидные последовательности целевых генов некоторых референтных изолятов ВЛКРС, представленные в международном банке данных *GenBank,* ресурса *NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Расчет эволюционных дистанций произведен с использованием модели Джукса-Кантора (*Jukes, Cantor*, 1969).

Генотипы ВЛКРС дифференцировали согласно классификации, предложенной *S.M. Rodriguez et al.,* 2009 с последующими дополнениями.

Возможен экспорт массивов данных таблиц в *Access* и использование такого алгоритма в дальнейшем для построения ГИС (геоинформационной системы) с применением программного обеспечения *ArcGIS* [3].

Результаты и обсуждения. Массив БД ВИЭВ составляет 186 нуклеотидных последовательностей с присвоенными каждой уникальным названием и порядковым номером.

На основании результатов ранее проведенного филогенетического анализа целевых генов (*env*, *pol*) ВЛКРС были обработаны массивы генетической информации: 148 и 38 изолятов, соответственно. Наполнены основные объекты базы данных нуклеотидных последовательностей ВЛКРС. Полученные массивы данных систематизированы, структурированы и преобразованы в актуальную версию. БД

представляет информацию, которая упорядочена определенным образом в рамках заданной структуры (*Табл. 1*).

Таблица 1. Структура базы данных нуклеотидных последовательностей ВЛКРС ВИЭВ

N п/п	Информация об изоляте										Информация о животном, от которого выделен изолят							Упоминание информации об изоляте			
																		в публикации		в отчетности	
	Название изолята	per.N в GenBank (NCBI)	Год регистрации в GenBank (NCBI)	Год взятия материала	Год выделения изолята	Ген провируса	Генетический статус	Источник выделения (биоматериал)	Страна	Область, регион	Шифр	Инв. N/кличка животного	Вид животного	Возраст, г/р	Порода	Условия содержания	Хозяйство	Примечание	да/нет	год	да/нет	год

Созданная БД включает информацию, содержащуюся в столбцах, со следующими именами: источник выделения, годы взятия биоматериала, выделения изолята, географическая принадлежность; блока информации о животном, от которого выделен изолят - вид, возраст, порода, условие содержания, хозяйство. В отдельном информационном блоке фиксируется присутствие данных о каждом изоляте в публикации и отчетных данных.

Ранее проведенный нами филогенетический анализ на основе гена *env* позволил оценить гетерогенность исследуемой популяции ВЛКРС. Изучение полиморфизма ВЛКРС, циркулирующего на территориях 6 ФО РФ, проводились на крупном рогатом скоте в возрасте от 7 месяцев до 11 лет 7 разных пород [2,3]. Так, на территориях Пензенской, Ростовской, Рязанской, Новосибирской, Московской областей циркулирует более одного (2-4) генотипа ВЛКРС вируса. Для Пензенской области характерно присутствие 2-х (*IV, VII*), для Ростовской 3-х (*I, II, IV*) и для Рязанской 2-х (*II, IV*) генотипов ВЛКРС. В остальных регионах выявлено по одному генотипу вируса. Степень дивергенции между последовательностями исследуемых изолятов из БД ВИЭВ и известных мировых референтных штаммов составляет от 0,005 до 0,012 (0,5-1,2%) в зависимости от генетиче-

ского варианта ВЛКРС. Минимальные значения внутригрупповых дистанций наблюдается для *II* генотипа, максимальные – для *I*, что коррелирует с данными других исследователей [12] и *VIII* генотипов ВЛКРС.

При изучении генетического разнообразия ВЛКРС выявлено 5 генотипов вируса – *IG, IIG, IVG, VIIG, VIIIG* (***рис. 1***). При этом, основная доля циркулирующих провирусов приходится на *IVG* генотип, так называемый «европейский кластер». Данный генетический вариант вируса доминирует на обследованных территориях.

Рисунок 1. Диаграмма популяционной структуры ВЛКРС на территории России.

По результатам филогенетического анализа на основе гена *pol* была установлена гомогенность исследуемой популяции ВЛКРС. Исследуемые изоляты из регионов РФ кластеризуются с изолятами, к которым относятся также штаммы из Аргентины, Австралии, Японии, США, Бразилии. Тем не менее, исследуемые изоляты отличаются от штаммов из США (M10987 *BLV GAGA*), Северной Италии (*S*83529), Уругвая (HE967303), а также США (*NC*001414, *AF*033818), России и Украины, Уругвая (HE967301), составляющих отдельные клады. Степень дивергенции внутри группы в среднем составляет

0,022±0,009 (2,2%), что соотносится с данными других исследователей [11].

На сегодняшний день в международный генетический банк данных депонированы охарактеризованные нуклеотидные последовательности генов ВЛКРС: *env* (как частичные участки, так и последовательности полного гена) – 77 и локусов гена *pol* – 9.

Создание с 2009 г. собственной компьютерной БД ВИЭВ по нуклеотидным последовательностям изолятов ВЛКРС имеет важное научное и практическое значение. Преобладание IV генотипа («европейский кластер») является отражением длительной циркуляции на территории России варианта ВЛКРС, изначально возможно попавшего с территории Восточной Пруссии (где лейкоз КРС был выявлен еще в 1916 году) при вхождении районов Мемеля (Клайпеда) и Кёнигсберг (с 1946 г. Калининград) в состав СССР [6], а также ввезённого из стран Европы с инфицированным крупным рогатым скотом после второй мировой войны в результате проведения торговых операций [10].

Не имея информации о движении скота, к сожалению, нельзя определить причину появления необычных вариантов ВЛКРС и дифференцировать это как результат мутагенеза давно циркулирующего в данном регионе возбудителя или завоза с импортным скотом. В большинстве случаев для выявленных на территории РФ генетических вариантов ВЛКРС, как правило, отсутствуют данные по происхождению и перемещению инфицированного скота. Обладая информацией о движении скота как внутри страны, так и в случае покупки скота из неблагополучных по лейкозу стран нам удавалось устанавливать принадлежность полученных изолятов вируса. Интересно, что результаты филогенетических анализов на основе двух целевых генов в некоторых случаях коррелировали между собой [1,3].

Возможность быстрого получения и анализа большого количества генетической информации при изучении распространения инфекционных заболеваний с последующей разработкой мер по их предотвращению и ограничению позволяет решать традиционные задачи эпизоотологии на молекулярном уровне.

Выводы. Проведено наполнение собственной БД ВИЭВ нуклеотидных последовательностей изолятов ВЛКРС, распространенных на территории РФ с определением для каждого генетического статуса на основе филогенетического анализа по генам *env, pol*.

Сформирована собственная БД ВИЭВ, которая упорядочена определенным образом в рамках заданной структуры.

Проанализировано распределения охарактеризованных генетических вариантов ВЛКРС на обследованных территориях некоторых регионов РФ.

Определены генетические гетерогенность по гену *env* и гомогенность по гену *pol* анализируемой популяции возбудителя.

На сегодняшний день в международный банк данных депонировано 86 охарактеризованных последовательностей генов *env, pol* изолятов ВЛКРС.

Финансирование: данная работа выполнена в рамках государственного задания по теме 0578-2014-0004 «Сформировать базу данных генетического полиморфизма вариантов вируса лейкоза крупного рогатого скота, распространенных на территории России».

Конфликтные интересы: авторы статьи заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература

1.Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Генджиева О.Б., Козырева Н.Г. Генотипирование изолятов ВЛКРС, распространенных на территории республики Калмыкия. Ветеринария Кубани, 2012, 4: 4-7.

2.Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А. [и др.]. Генетический полиморфизм вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории РФ. Российская сельскохозяйственная наука, 2016, 5:56-59.

3.Козырева Н.Г., Гулюкин М.И. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской федерации. Ветеринария Кубани, 2017, 6: 4-9.

4.Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А. [и др.] Филогенетический анализ участка гена pol изолятов провируса лейкоза КРС, обнаруженных у животных из различных хозяйств регионов Российской Федерации. Доклады Российской Академии с.- х. наук, 2011, 6: 48-51.

5.Козырева Н.Г., Иванова Л.А., [и др.] Определение генетического статуса изолятов ВЛКРС, распространенных на территории Московской области ЦФО РФ. Сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Молекулярная диагностика – 2017». М., 2017, т.2: 394-395.

6.Лейкозы и злокачественные опухоли животных [Текст] / Под ред. В.П. Шишкова, Л.Г. Бурбы. М., Колос, 1977, 375 с.

7.De Brogniez A., Bouzar A.B., Jacques J.R. et al. Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus. J. Virol., 2015, 89(17): 8945-56.

8.Mansky L.M., Temin H.M. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. J. Virol., 1994, 68: 494-499.

9.Pluta A., Albritton L.M., Rola-Łuszczak M., Kuźmak J. Computational analysis of envelope glycoproteins from diverse geographical isolates of bovine leukemia virus identifies highly conserved peptide motifs. J. Retrovirology, 2018, 15:2. URL: https://doi.org/10.1186/s12977-017-0383-0.

10.Polat M., Takeshima S.N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. J. Virol., 2017, 14:209 (doi: 10.1186/s12985-017-0876-4).

11.Polat M., Takeshima S.-n., Hosomichi K. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. J. Retrovirology, 2016, 13:4: 23p. URL: http://retrovirology.biomedcentral.com/articles/ 10.1186/s12977-016-0239-z.pdf.

12.Rola-Łuszczak M., Pluta A., Olech M. et al. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. PLoS ONE: electronic recource, 2013, 8(3). URL: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone. 0058705.

УДК 619:579

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНОК УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ И ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Кононенко А.Б., канд. биолог. наук, доцент, ведущий научный сотрудник

Банникова Д.А., канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник

Павлова И.Б., д-р биолог. наук, главный научный сотрудник

Бритова С.В., канд. вет. наук, старший научный сотрудник

Лаборатория санитарной микробиологии

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН» 123022, Москва, РФ, +7(499) 256-54-73, vniivshe@mail.ru

Резюме. Объектом исследований являлись полевые культуры родов Salmonella, Escherichia, Proteus, Enterobacter, Citrobacter, Yersinia, Staphylococcus. Биопленки изучали методом статического культивирования в 96-луночных планшетах, с последующим количественным учетом связанного красителя методом спектрофотометрии. Морфологию биопленок и фазы ее развития изучали методом световой и сканирующей электронной микроскопии. Показано, что интенсивность образования биопленок патогенными микроорганизмами, такими как сальмонеллы, иерсинии, золотистый стафилококк была несколько выше, чем у непатогенных: эшерихии, протей, цитробактер, энтеробактер. Предложена методика приготовления препаратов бактерий для световой и сканирующей электронной микроскопии на покоровных стеклах, позволяющая без нарушения естественной архитектоники бактериальной популяции изучать фазы развития биоплёнок.

Ключевые слова: энтеробактерии, биоплёнки, световая и электронная микроскопия.

FORMATION OF BIOFILMS BY CONDITIONAL-PATHOGENIC AND PATHOGENIC BACTERIA

Kononenko A.B., Bannikova D.A., Pavlova I.B., Britova S.V.
Laboratory of Sanitary Microbiology
All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center – K. I. Skryabin, Ya. R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences» 123022, Moscow, Russian Federation +7(499) 256-54-73, vniivshe@mail.ru

The object of research was the field crops of the genera Salmonella, Escherichia, Proteus, Enterobacter, Citrobacter, Yersinia, Staphylococcus. Biofilms were studied by static culture in 96-well plates, followed by quantitative analysis of the bound dye by spectrophotometry. The morphology of biofilms and the phase of its development were studied by light and scanning electron microscopy. It is shown that the intensity of biofilm formation by pathogenic microorganisms, such as Salmonella, Yersinia, Staphylococcus aureus, was slightly higher than in nonpathogenic ones: Escherichia, Proteus, Citrobacter, Enterobacter. A method for making bacterial preparations for light and scanning electron microscopy on dodgy glasses is offered, which allows to study the phases of biofilm development without disturbing the natural architectonics of the bacterial population.

Key words: enterobacteria, biofilms, light and electron microscopy.

Введение. Биоплёнки представляют собой наиболее распространенную форму организации жизнедеятельности микроорганизмов. Биоплёнку можно определить как микробное сообщество,

состоящее из клеток, прикрепленных к поверхности, объединенных матриксом, представляющим собой сложную смесь полисахаридов, гликопептидов, нуклеиновых кислот и липидов (2, 3). Роль биоплёнки заключается в защите находящихся в ней микроорганизмов от неблагоприятных факторов среды обитания. Матрикс биоплёнки разделен каналами, через которые транспортируются питательные вещества и кислород, одновременно с этим выводятся метаболиты микробных клеток (5, 6, 10).

Достоверно установлено, что биоплёнки являются основной причиной развития всех хронических и рецидивирующих инфекций (4, 5). Бактерии, обитающие в биоплёнках, существенно отличаются по своим биологическим свойствам от планктонных форм. Структура и физиология биоплёнок обеспечивают повышенную устойчивость сообщества по сравнению с планктонными культурами к антимикробным препаратам. Микроорганизмы, входящие в состав биопленок, менее чувствительны к большинству антибиотиков и другим биоцидным веществам (7).

Одна из первых работ, в которой описан метод культивирования, индикации и изучения способности формирования биопленок в медицинской практике, опубликована еще в 1985 г. (9). Методология выращивания биоплёнок разделилась на два направления: динамическое - культивирование при имитации естественных условий обитания микроорганизмов и статическое. К динамическим можно отнести использование ферментеров, различных аппаратов, силиконовых трубок, через которые постоянно подается питательная среда. Вторая группа методов основана на создании статических условий культивирования микроорганизмов. Используются также методы биолюминесценции. Значительное место в изучении биопленок занимает электронная микроскопия, позволяющая визуализировать биопленку, изучить все стадии ее формирования (1, 5, 8).

Материалы и методы. В работе использовали полевые культуры родов Salmonella, E. coli Yersinia, Proteus, Citrobacter, Enterobacter, Staphylococcus.

Для получения биоплёнок использовали полистироловые 96-луночные планшеты. В лунки вносили мясопептонный бульон, инокулировали суточную культуру микроорганизмов, предварительно установив концентрацию 10^4 м.к./мл, и инкубировали в течение 17-18 ч при температуре 37°С. Затем удаляли из лунок среду с планктонными клетками, вносили по 200 мкл отфильтрованного 0,1% раствора кристаллического фиолетового и выдерживали планшеты в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Затем удаляли из лунок краситель. Не связавшийся краситель смывали физиологическим раствором или дистиллированной водой. Наличие и плотность биоплёнки определяли визуально по интенсивности окрашивания поверхностей планшета. Затем для экстракции краски из плёнки добавляли по 200 мкл 96% этанола и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре КФК -3КМ при длине волны 490 нм.

Для изучения формирования биопленок в полужидких и жидких питательных средах использовали 24-часовые культуры микроорганизмов в S-форме, выращенные на плотных или жидких питательных средах. Взвесь бактерий в концентрации 10^5 м.к./мл в объеме 5 мл встряхивали на аппарате Vortex и вносили в чашки Петри с 20 мл мясопептонного бульона. На стерильных предметных стеклах располагали стерильные обезжиренные покровные стекла и погружали их в жидкую питательную среду в чашках Петри. Материал инкубировали в течение 18-24 часов при температуре 37°С. Затем извлекали покровные стекла и часть из них окрашивали 1%-ным водным раствором метиленового синего (для световой микроскопии), а часть размещали в чашках Петри на фильтры (для электронной микроскопии). Последние в целях сохранения естественной архитек-

тоники прижизненно фиксировали парами 25%-ного глутарового альдегида в течение 3-5 ч. Полученные препараты после обезвоживания парами пропиленоксида и напыления ионами золота просматривали в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ).

Морфологические исследования проводили с использованием светового микроскопа с оптической приставкой Optica Vision Pro (Италия) и сканирующего электронного Hitachi-TM 3030 (Япония).

Результаты исследований. Способность образовывать биоплёнки была выявлена у всех изученных культур. При оценке результатов, полученных в экспериментах, исходили из того, что интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствует степени плёнкообразования. Визуальная оценка плотности биоплёнки показала, что непатогенные культуры микроорганизмов (E. coli, Proteus, Citrobacter, Enterobacter) образовывали менее плотную биоплёнку, чем патогенные (S.typhimurium, Y.enterocolitica, S.aureus). Количественным выражением степени образования биоплёнок служили значения оптической плотности спиртовых экстрактов краски из лунок планшета, измеренные на спектрофотометре (рис. 1).

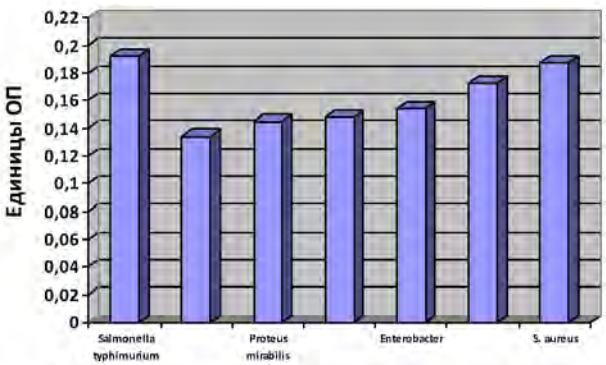


Рис. 1 Степень образования биопленок различными микроорганизмами.

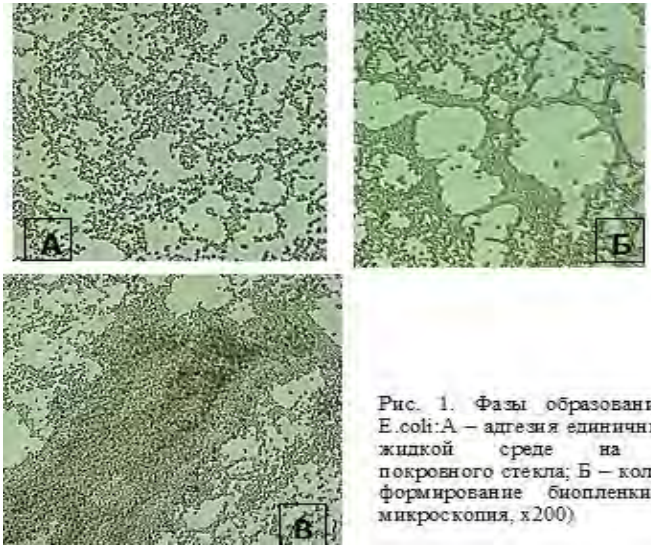


Рис. 1. Фазы образования биопленки E.coli:А – адгезия единичных бактерий в жидкой среде на поверхности покровного стекла; Б – колонизация; В – формирование биопленки (световая микроскопия, х200)

Методика, основанная на приготовлении препаратов культур микроорганизмов с сохранением естественной архитектоники, позволила детализировать процесс образования биоплёнок и их структуру. Результаты световой и электронной микроскопии представлены на рисунках.

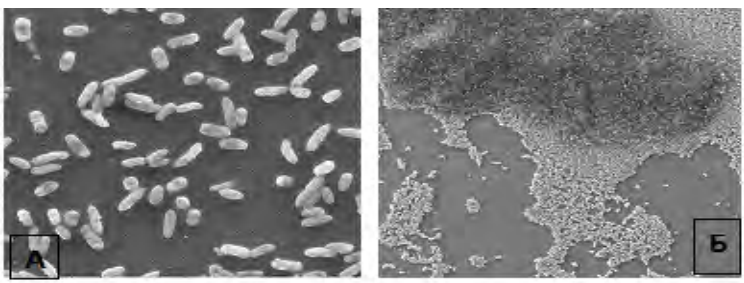


Рис. 2. Биопленка E.coli. А – адгезия единичных бактерий, х10000; Б – фазы колонизации и формирования биопленки, х4000(СЭМ)

Исследование препаратов бактерий выявило на первом этапе рост единичных адгезированных микробных клеток (рис. 2А). Затем

наблюдался процесс колонизации, при этом клетки объединялись в структуры путем формирования межклеточного матрикса (рис. 2Б). В последующем образовывалась плотная биопленка сложной структуры (рис. 2В). Сканирующая электронная микроскопия препаратов позволила также выявить вначале адгезированные единичные микробные клетки (рис. 2А), а затем формирование плотной биопленки, под которой просматривались отдельные бактерии (рис. 3Б).

Заключение. Апробирован метод получения биоплёнок в статических условиях культивирования микроорганизмов с использованием 96-луночных пластиковых планшетов. Количественный учет связанного красителя методом спектрофотометрии позволяет проводить сравнение способности образования биоплёнки различными микроорганизмами.

Предложена методика приготовления препаратов бактерий для световой и сканирующей электронной микроскопии на покровных стеклах. Методика позволяет без нарушения подвижных гелеобразных компонентов изучать фазы развития биоплёнок и получать объективные данные о морфологии популяций бактерий с сохранением их естественной архитектоники.

Представления о биоплёнках, подтверждённые современными методами исследований, могут кардинально изменить подходы к лечению инфекционных заболеваний. Находят всё новые данные о том, что хронические и рецидивирующие инфекции принципиально отличаются от острых заболеваний образованием устойчивых, трудно поддающихся терапии бактериальных биоплёнок. Устойчивость биоплёнок определяется не только механической защитой бактериальных клеток от неблагоприятных воздействий, но и морфологическим и фенотипическим разнообразием микроорганизмов, входящих в состав биоплёнки. В результате лечение инфекционного процесса

направляется всего лишь на часть микроорганизмов, участвующих в нём. Не вызывает сомнений тот факт, что современная диагностика и терапия инфекционных заболеваний должна включать знания о существовании, развитии и особенностях формирования биоплёнок.

Литература

1.Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012.- № 14.- Т. 1.- С. 17-22.

2.Ножевникова А.И., Бочкова Е.А., Плаунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. Микробиология.- 2015.- Т. 84.- № 6.- С. 623-644.

3.Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журнал микробиологии и иммунологии. 2011.- № 3.- С. 99-109.

4.Романова Ю.М., Диденко Л.В., Топордава Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий их их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками. Вестник РАМН.2011. - № 10.- С.31-39.

5.Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г.. Ультраструктура микробных биопленок при межклеточных взаимоотношений бактерий в сообществах. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.-2014.- № 4.- С. 87-92.

6.Смирнова Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. Микробиология. 2010.- Т. 79.- № 4.- С. 453-446.

7.Чеботарь, И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П., Антибиотикорезитентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2012.- № 14(1).- С. 51-58.

8.Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А. и др. Современные технологии исследования бактериальных пленок. Современные технологии в медицине: научный журнал.- 2013. - Т. 5. - № 1.- С. 14-20.

9.Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiology. 1985.- № 22(6) .- P. 996-1006.

10.Flemming H.C., Wingender J., The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol.- 2010.- № 14.- P. 2535-2554.

УДК 636.09:616.98

АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВИРУСАМИ СЕМЕЙСТВА FILOVIRIDE

Мазур Т.В., доктор ветеринарных наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и биотехнологии факультета ветеринарной медицины, doktorvet67@ukr.net

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, 03041, ул. Полковника Потехина,16, 12-й учебный корпус, Киев, Украина, +38 0975129005

Аннотация. К опасным вирозам, которые имеют тенденцию к значительному распространению, относится семейство *Filoviridae*, которое включает 3 рода: Лловиу, Марбург и Эбола. Выявлено 5 видов Эбола: Заир, Бундибуджио, Судан, Рестон и Таи форест. Первые три из них ассоциируются с причинами значительных эпидемий. Временные границы появления инфекций, обусловленных семейством филовирусов, географическая приуроченность и определенные генетические видовые отличия вынуждают проводить анализ эпизоотической и эпидемической ситуаций с целью выявления природного резервуара филовируса, который время от времени вступает в контакт с чувствительными к нему живыми организмами, вследствие чего возможно развитие тяжелого заболевания с классическим симптомокомплексом.

Ключевые слова. Филовирусы, эмерджентные заболевания, эпизоотическая ситуация, резервуар и вектор вируса.

ANALYSIS OF POTENTIAL HAZARDS CAUSED BY VIRUSES OF THE FILOVIRIDE FAMILY

Mazur T.V., doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, doktorvet67@ukr.net
National University of life and environmental sciences of Ukraine, 03041, Polkovnik Potekhin str., 16, 12th educational building, Kyiv, Ukraine, +38 0975129005

Annotation. Dangerous virosis, which tends to spread significantly, includes the family *Filoviridae*, which includes 3 genera: Llowiy, Marburg and Ebola. There were 5 species of Ebola: Zaire, Bundibugjo, Sudan, Reston and Tai Forest. The first three of them are associated with the causes of significant epidemics.

The temporal boundaries of the emergence of infections caused by the family of filoviruses, geographic proximity and certain genetic differences make it necessary to analyze the epizootic and epidemic situations in order to identify a natural reservoir of the filovirus, which from time to time comes into contact with sensitive living organisms, resulting in the development of a serious disease with a classic symptom complex.

Key words. Filoviruses, emergent diseases, epizootic situation, reservoir and vector of the virus.

Summary. The evolution of various viruses in nature is unequal and has its own characteristics. One of the most important aspects of the evolutionary process in pre-cellular parasites, including filoviruses, is the change in the pathogenicity spectrum of existing viruses and the appearance of new, early unknowns, their activation, which may inevitably lead to the emergence of outbreaks of emergent diseases. The analysis of the geographically-geographically timed cases of detection of filoviruses in different parts of the globe indicates the potential role of predatory mammals in the circulation of the Ebola virus in the outbreak centers. However, in localities where viral outbreaks are detected, in 30% of domestic dogs, specific antibodies to this virus were detected. Since these animals are characterized by asymptomatic carriage, they are a potential reservoir

of the Ebola virus. The highest probability of the role of the reservoir and vector of the Ebola virus in tropical and subtropical climatic zones belongs to the representatives of the zoofauna - the family of *Viverridae* (civets and genes), where the shelters are natural hollow structures (hollows, caves, grottoes). Often the same biotopes occupy several generations in succession of different species of bats. In conditions of general use of such biotopes, optimal conditions for the transmission of filoviruses through the products of vital activity are formed. As a result of the presence of specific features of existence in certain ecological niches, representatives of the *Viverridae* family are in close contact with a wide spectrum of different species of wild mammals that are carriers of the filovirus (the use of corpses as food). Simultaneously, they act as intermediaries during the transmission of pathogens of infectious diseases, including from bats to domestic animals and humans.

Оценка характера и динамики эпизоотической и эпидемической ситуации, как известно, является важным аспектом прогнозирования при зоонозах. Не спрогнозированное заболевание, вышедшее из-под контроля, способно представлять угрозу те только для отдельных государств, систематически страдающих от его возникновения, но и угрозу для всего мирового сообщества.

Эволюция различных вирусов в природе неравнозначна и имеет свои особенности. Одним из важнейших аспектов эволюционного процесса у доклеточных паразитов является изменение спектра патогенности существующих вирусов и появление новых, раннее неизвестных, их активизация, что неминуемо может повлечь появление вспышек эмерджентных заболеваний.

Системное исследование новых вирусов, которые в последнее время начали выделяться с незаурядной частотой, может быть обусловлено существованием следующих природных механизмов:

1) изменение экологии местности: обычно оно связано с проведением сельскохозяйственных работ, когда восприимчивые организмы вынуждены контактировать с переносчиками или временными хозяевами вирусов;

2) попадание не иммунных особей в эндемические районы, где местная фауна имеет популяционный иммунитет;

3) изменение свойств вирусов, связанное с реасортацией генов вирусов растений, насекомых или диких животных;

4) появление новых стабильных мутантов существующих вирусов.

Не является исключением вирусы семейства *Filoviridae* [1-10].

Исходя из результатов тщательного анализа эпизоотической и эпидемической ситуации по опасным вирозам, которые имеют тенденцию к значительному распространению, особое внимание привлекает семейство Filoviridae, которое включает 3 рода: Лловиу, Марбург и Эбола. Выявлено 5 видов Эбола: Заир, Бундибуджио, Судан, Рестон и Таи форест. Первые три из них ассоциируются с причинами значительных эпидемий. Неординарными представителями семейства является вирус Эбола Рестон, выделенный от свиней, которые не имели клинических признаков заболевания, однако имел определенную опасность для приматов, и вирус Лловиу - выделенный из организма летучих мышей в пещерах Испании, не обладающий патогенностью для человека.

В результате проведеного тщательного сравнительно-исторического анализа судьбы филовирусов вияснилось, что в 1945 году во время вспышки заболевания с высокой летальностью на территории Крыма был выделен вирус - возбудитель лихорадки Крым-Конго. В связи со схожестью его генома с геномом вируса Эбола этот инфекционный агент внесен в группу эболаподобных вирусов. Таким образом, временные границы появления инфекций, обусловленных семейством филовирусов, географическая приуроченность и определенные генетические видовые отличия вынуждают проводить анализ эпизоотической и эпидемической ситуаций с целью выявления природного резервуара филовируса, который время от времени вступает в контакт с чувствительными к нему живыми организмами, вследствие чего возможно развитие тяжелого заболевания с классическим симптомокомплексом.

Анализ территориально-географической приуроченности случав выявления филовирусов в разных уголках Земного шара свидетельствует о потенциальной роли хищных млекопитающих в циркуляции вируса Эбола в очагах неблагополучия. Однак в местностях, где регистрируются вспышки вироза, у 30% домашних собак были выявлены специфические антитела к этому вирусу. Поскольку для таких животных характерным является бессимптомное носительство, они являються потенциальным резервуаром вируса Эбола.

Наиболее высокая вероятность роли резервуара и вектора вируса Эбола в тропических и субтропических климатических зонах принадлежит представителям зоофауны - семейству *Viverridae* (циветы и генеты), местами укрытия которых являются природные полые структуры (дупла, пещеры, гроты). Часто эти же биотопы заселяют несколько поколений подряд различных видов рукокрылых. В условиях общего использования подобных биотопов формируются оптимальные условия для трансмиссии филовирусов через продукты жизнедеятельности. В результате наличия специфических особенностей существования в определенных экологических нишах, представители семейства *Viverridae* тесно контактируют с широким спектром разных видов диких млекопитающих, которые являются носителями филовируса (использование трупов в качестве корма). Одновременно они выступают в роли промежуточного звена во время передачи возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе и от рукокрылых к домашним животным и человеку.

Таким образом, на фоне глобального обострения эпизоотической и эпидемической ситуаций, связанного с активизацией доклеточных паразитов, в том числе филовирусов, – возбудителей эмерджентных заболеваний, складываются обстоятельства, порождающие необходимость проведения постоянного контроля подобных инфекций. Важной составляющей такой работы является определение резервуара и вектора филовирусов в традиционно сформированных экологических нишах.

Литература

1. Miranda M.E, Yoshikawa Y, Manalo D.L.et al. Chronological and spatial analysis of the 1996 Ebola Reston virus outbreak in a monkey breeding facility in the Philippines, *Exp nim*, 2002, vol.51(pg.173-9) Google Scholar Cross Ref Pub Med

2. Miranda M.E, White M.E, Dayrit M.M, Hayes C.G, Ksiazek T.G, Burans J.P. Seroepidemiological study of filovirus related to Ebola in the Philippines, *Lancet ,*1991,vol.337(pg.425-6) Google ScholarCrossRefPubMed

3. Miranda M.E, Ksiazek T.G, Retuya T.J., et al. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996, *Infect Di.s*,1999,vol.179Suppl 1 (pg.S115-9) Google ScholarCrossRefPubMed

4. World Health Organization. WHO experts consultation on Ebola Reston pathogenicity in humans. WHO/HSE/EPR/2009.2. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services, 2009

5. CDC. Ebola virus infection in imported primates, Virginia, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1989, vol.38 (pg.831-2)837–838 Google ScholarPubMed

6. Jahrling P.B, Geisbert T.W, Dalgard D.W, et al. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA, *Lancet* , 1990, vol. 335 (pg. 502-5)Google ScholarCrossRefPubMed

7. Hayes C.G., Burans J.P., Ksiazek T.G., et al. Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus, *Am J Trop Med Hyg*, 1992,vol. 46 (pg.664-71)Google ScholarCrossRefPubMed

8. De Marcus T.A., Tipple M.A., Ostrowski S.R. US policies for disease control among imported nonhuman primates, *J Infect Dis*, 1999, vol.179 Suppl 1(pg. S281-2) Google cholar CrossRef PubMed

9. Rollin P.E., Williams R.J, Bressler D.S.,et al. Isolated cases of Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States, *J Infect Dis*,1999, vol. 179 Suppl 1(pg. S108-S14) Google Scholar CrossRef PubMed

10.Feng Y, Zhao T, Nguyen T, et al. Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007, *Emerg Infect Dis* , 2008, vol. 14 (pg. 1774-6) Google Scholar CrossRef PubMed

УДК 619:616.988:636.22

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, СОДЕРЖАЩЕГО ПРИОННЫЙ БЕЛОК – ИНФЕКЦИОННЫЙ АГЕНТ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КОРОВ

Надточей Г. А., кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии, g_a_nadtochei@mail.ru

Антипин А.А., научный сотрудник, лаборатория молекулярной цитопатологии и электронной микроскопии, antipinbio-tech@yandex.ru

ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН,

109428, г. Москва, Российская Федерация, +7 (495) 970-03-69.

АННОТАЦИЯ. Биологический материал из тканей головного мозга коровы второго пассажа экспериментальной губкообразной энцефалопатии исследован методами патогистологии, ИФА, иммуноблоттинга и электронной микроскопии.

Получены препараты, содержащие прионный белок - инфекционный агент губкообразной энцефалопатии коров.

Ключевые слова: губкообразная энцефалопатия коров, прион.

OBTAINING AND ANALYSIS OF BIOLOGICAL MATERIAL CONTAINING THE INFECTION AGENT OF BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY PRION PROTEI

Nadtochey G.A., Antipin A.A.,

All-Russian K.I. Skrjabin and Ja. R. Kovalenko Institute of Experimental Veterinary Science, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT. The most significant is bovine spongiform encephalopathy of cows among detectable infectious prion disease in many countries of the world. This disease is dangerous to humans and also highly resistant to conventional disinfection methods. At present, there is no complete knowledge of all forms of prion infectious agent structures. To study the pathogenesis and improve diagnostic systems for this disease, biological materials obtained as a result of experimental infection of animals are needed.

The subjects of the study were preparations of the brain sections of the cow infected of experimentally spongiform encephalopathy, frozen at -80^{0}C or fixed with neutral formalin. Infection was carried out intravenously with the brain preparation of the cow - the first passage of bovine spongiform encephalopathy obtained from Great Britain in 1990.

To obtain biological material were investigated tissue samples of cow with experimental bovine spongiform encephalopathy by pathohistology, ELISA, im-munoblotting and electron microscopy methods. Pathomorphological analysis of the samples showed the presence in the tissues of the vacuolization of neurons with bilateral symmetry and other changes characteristic of spongi-form encephalopathy. Based on the results of ELISA (Bovine Spongiform Encephalopathy-Scrapie Antigen Test Kit, IDEXX) in the brain sections of the cows with bovine spongiform encephalopathy in the cerebellum and medulla oblongata preparation confirmed the presence of the bovine spongiform encephalopathy pathogen. Prion proteins with a molecular weight of 14; 30 and approximately 45-50 kD have been identified by immunoblotting. Electron microscopy by the method of negative contrasting revealed numerous fibrils with a diameter of 10-20 nm in length from 165 to 215 nm. Infection agent of bovine spongiform encephalopathy prion protein containing preparations were obtained.

Key words: prion; bovine spongiform encephalopathy**.**

Среди выявляемых инфекционных прионных заболеваний во многих странах мира наибольшую значимость приобрела губкообразная энцефалопатия коров (так называемое "бешенство коров") в связи с доказанной возможностью передачи этого заболевания людям и ее эпидемической опасностью [1]. Высокая опасность патогенных прионов определяется их устойчивостью к обычным методам обеззараживания [2].

В настоящее время нет полного знания о всех формах структур прионного инфекционного агента, вызывающего губкообразную энцефалопатию коров. В связи с этим для изучения патогенеза и совершенствования диагностических систем для этого заболевания необходимы биологические материалы, полученные в результате экспериментального заражения животных. Целью исследования было получение биологического материала, содержащего прионный белок - инфекционный агент губкообразной энцефалопатии коров.

Материалы и методы. Объектами исследования были препараты тканей отделов головного мозга ЦНС коровы, экспериментально зараженной губкообразной энцефалопатией, замороженные при -80^0С или фиксированные нейтральным формалином. Заражение проводилось в трехмесячном возрасте. Внутривенно ввели 8 мл 10% гомогената в питательной среде 199 тканей мозга коров первого пассажа губкообразной энцефалопатии. Заражение для первого пассажа проводилось интрацеребрально 0,3-0,4 мл 10% гомогенатом в питательной среде 199 препарата мозга больной коровы, полученного в 1990 г. от ветеринарной службы Великобритании. После внутривенного заражения через 2 года 7 месяцев проявились клинические признаки губкообразной энцефалопатии и через два месяца был произведен забой коровы. Контроль наличия в патологическом материале прионов возбудителей губкообразной энцефалопатии проводили методами ИФА (Bovine Spongiform Encephalopathy-Scrapie Antigen

Test Kit, IDEXX) и иммуноблоттинга. Наличие специфических патологических изменений в тканях ЦНС определяли гистологическим методом с окрашиванием срезов гематоксилином и эозином. Прионный белок выделялся по методу Prusiner S.B. et al. [3]. Морфологические структуры, образуемые им, изучали электронной микроскопией методом негативного контрастирования на электронном микроскопе JEOL-100CX.

Результаты. Для подтверждения диагноза пробы тканей головного мозга коровы с экспериментальной губкообразной энцефалопатией, фиксированные нейтральным формалином, были заключены в парафин стандартным гистологическим методом. Приготовленные срезы каждой пробы окрашивали гемотоксилин-эозином. Морфологический анализ проб показал наличие в тканях вакуолизации нейронов с билатеральной симметрией и других изменений, характерных для губкообразной энцефалопатии (Рис.1).

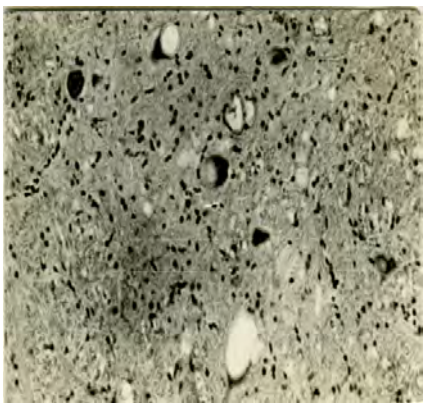


Рисунок 1. Срез продолговатого мозга больной губкообразной энцефалопатией коровы №8645. Вакуолизация нейронов. Х 150.

По результатам ИФА в пробах отделов ЦНС больной губкообразной энцефалопатией коровы из мозжечка и продолговатого мозга подтверждено наличие патогена губкообразной энцефалопатии коров.

В препаратах продолговатого мозга не менее чем в 1,9 раз больше концентрация патогена.

Прионный белок выделяли методом центрифугирования в градиенте 60%-25% сахарозы при 40000 об/мин в роторе SW 41 Ti в течение 180 минут (Prusiner S.B. et al.,1993). Градиент делили на 3 фракции. Методом Лоури определяли количество белка, содержащегося в верхней, средней и нижней фракциях градиента сахарозы. В качестве стандарта использовали альбумин сыворотки крови коров. Пробы фракций градиента, содержащие примерно 100 нг белка разводили в электрофоретическом буфере с 2% додецилсульфата натрия и 5% β-меркаптоэтанола и прогревали при 100^0C в течение 2 минут. Электрофорез проб проводили по Лэммли (1970) в 15% ПАА геле (микросистема Bio-Rad). По окончании электрофореза гели окрашивали серебром (по Oakley et al., 1980). Основная полоса выявлялась в зоне около 30 кД, слабые полосы контаминации окрашивались в зонах, соответствующих примерно 14 и 40 кД в пробах средней и нижней фракций. С пробами средней и нижней фракций провели электрофорез в 15% ПАА геле, как указано выше. Белки из геля перенесли влажным методом на PVDF мембраны с помощью ячейки минитрансблоттера фирмы БиоРад. Иммуноокрашивание провели моноклональными антителами из набора БиоРад для выявления прионного белка. Дорожки с исследуемыми пробами обработали мечеными антителами к мышиному иммуноглобулину. Дорожку с маркёрами молекулярной массы обработали мечеными кроличьими антителами к маркерам (БСА, химотрипсину и мономеру цитохрома С). В дорожке нижней и средней фракции белок с молекулярной мас-

сой 40 кД антителами не выявлен и представляет собой неспецифический белок. В дорожке нижней фракции специфическая иммунореакция выявлена с белками 14 и 30 кД. В дорожке средней фракции специфично окрасились три полосы с белками молекулярной массой 14; 30 и примерно 45-50 кД (Рис. 2).

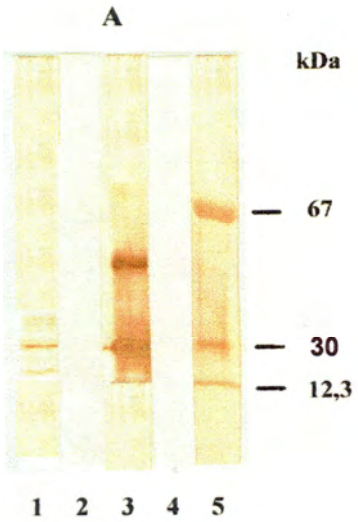


Рисунок 2 . Результаты определения чистоты прионного белка, содержащегося в средней и нижней фракциях сахарозного градиента методом иммуноблота. Дорожки: 1 – Проба нижней фракции сахарозного градиента; 2 и 4 - Пробы ткани продолговатого мозга здоровой коровы, обработанной аналогично опытному материалу. 3 – Проба средней фракции сахарозного градиента. 5 – Маркеры молекулярной массы.

Морфологическую структуру белков фракций, полученных методом градиентного ультрацентрифугирования, изучали электронной микроскопией методом негативного контрастирования. в элек-

тронном микроскопе JEOL-100CX. В обеих фракциях выявлены многочисленные фибриллы диаметром 10-20 нм длинной от 165 до 215 нм (Рис.3 и Рис.4).

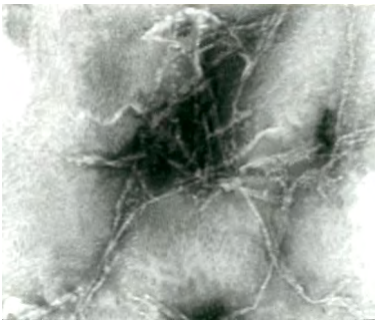


Рисунок 3.Электронная фотография пробы нижней фракции сахарозного градиента. Группа свободно лежащих фибрилл. Х 60000.

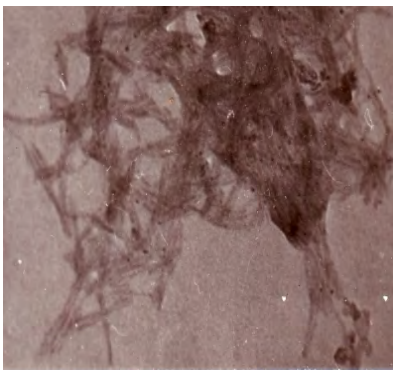


Рисунок 4. Электронная фотография пробы средней фракции сахарозного градиента. Скопление фибрилл в виде грозди. Х 45000.

Заключение. Получены препараты, содержащие прионный белок - инфекционный агент губкообразной энцефалопатии коров, пригодные для изучения биологических свойств патогенных прионов и совершенствования диагностических систем выявления прионных инфекций.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг., тема (проект) № 0578-2015-0002 «Создать лабораторную модель на кроликах и морских свинках для изучения биологических свойств патогенных прионов». Финансирование работы было получено в рамках Государственного задания из федерального бюджета без привлечения дополнительных источников финансирования.

Литература

1. Lasmezas C.I. et al. and Deslys J.P. (2001). Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeld-Jakob disease: implications for human health. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 4142-4147.

2. Надточей Г.А., Гулюкин М.И. (2012). Прионные инфекции: степень риска для животноводства и населения России. Жизнь без опасностей №2, 40-45.

3. Prusiner S.B. et al. (1993). Immunologic and molecular biologic studies prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. J.infect. Dis. 167, 602-613.

УДК: 619: 616. 98 : 579. 873. 21: 636. 22/28

УЧЕТ И ОЦЕНКАРЕЗУЛЬТАТОВ СИМУЛЬТАННОЙ ПРОБЫ С ППД ТУБЕРКУЛИНОМ ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И КАМ

А.Х.Найманов, д.в.н., профессор, главный научный сотрудник с исполнением обязанностей заведующего лабораторией микобактериозов, labmyc@mail.ru;

Г.И.Устинова, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии;

Н.Г.Толстенко, к.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микобактериозов;

Е.П.Вангели, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микобактериозов;

О.Д.Кучерук, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии;

В.М.Калмыков, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории микобактериозов.

ФГБНУ *«Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН», 109428, Москва, Рязанский пр-т, 24, к. 1, admin@viev.ru*

РЕЗЮМЕ. Представлено современное состояние диагностики туберкулёза у крупного рогатого скота. Указаны основные достоинства и недостатки аллергической диагностики, а также пути совершенствования дифференциальной диагностики неспецифических реакций в благополучных по туберкулёзу хозяйствах.

Ключевые слова: туберкулёз, микобактерии, неспецифические реакции, ППД туберкулин для млекопитающих, КАМ.

REGISTRATION AND EVALUATION OF THE RESULTS OF THE SIMULTANEOUS TEST WITH PPD TUBERCULIN FOR MAMMALS AND CAM

Naymanov A.H., Ustinova G.I., Tolstenko N.G., Vangeli E.P., Kucheruk O.D., Kalmykov V.M.

Federal Research Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko RAS (VIEV), Ryasansky Ave, 24, bldg 1, Moscow, Russian Federation, 109428.

SUMMARY. Present state of the diagnosis of tuberculosis in cattle is presented. The main advantages and disadvantages of allergic diagnostics as well as ways to improve the differential diagnosis of nonspecific reactions in tuberculosis-free farms are indicated.

Key words: tuberculosis, mycobacteria, nonspecific reactions, PPD tuberculin for mammals, CAM.

На современном этапе борьбы с туберкулёзом животных основой профилактических и оздоровительных мероприятий является диагностика болезни, а основным методом прижизненной диагностики – аллергический метод с применением внутрикожной пробы с ППД туберкулином для млекопитающих.

Недостаток внутрикожной пробы в том, что аллергическая реакция на её применение указывает только на сенсибилизацию организма животных различными видами микобактерий. А в связи с тем, что животные могут быть заражены не только микобактериями туберкулёза, но и разного вида близкородственными нетуберкулёзными микобактериями, проба выявляет наряду с больными и здоровых животных с неспецифическими реакциями на туберкулин [5,6].

В итоге проявление неспецифических реакций делает внутрикожную пробу ориентировочной и вызывает необходимость применения патологоанатомических и лабораторных исследований с целью подтверждения диагноза на туберкулёз.

В соответствии с Санитарными и Ветеринарными правилами от 1996 г. и Наставлением по диагностике туберкулёза животных от 2002 г. в нашей стране контроль за благополучием по туберкулёзу крупного рогатого скота проводят внутрикожной пробой с ППД для млекопитающих 2 раза в год (весной и осенью). Реагирующими счи-

тают животных с увеличением толщины кожной складки на 3 мм и выше. Причём реагирующие животные считаются подозреваемыми в заражении. Решающим в диагностике является патологоанатомическое или лабораторное подтверждение туберкулёза у убитых с диагностической целью животных.

В неблагополучных по туберкулёзу хозяйствах реагирующими так же считают животных с увеличением толщины кожной складки на 3 мм и выше, но при этом их считают больными и подвергают убою в течение 14 суток.

Проведённый нами анализ эпизоотической ситуации по туберкулёзу крупного рогатого скота показывает, что в последние годы в Российской Федерации увеличивается количество реагирующих животных с неспецифическими реакциями на туберкулин.

Так, за 2001-2017 годы, т.е. за последние17 лет в РФ было выявлено всего реагирующих – 824168животных, из них в благополучных хозяйствах – 748813 или 90,8%, а в неблагополучных хозяйствах – 76355 или 9,2%, т.е. в благополучных хозяйствах выявляется более 90% реагирующих животных.

В этой связи на современном этапе борьбы с туберкулёзом крупного рогатого скота наиболее актуальной проблемой является выявление реагирующих животных с неспецифической реакцией на туберкулин и совершенствование дифференциальной диагностики аллергических реакций в благополучных хозяйствах.

Анализ доступной литературы показывает, что со времени возникновения проблемы неспецифических реакций были предложены различные методы их дифференциации. Однако наибольшее признание и распространение во всём мире получил метод симультанной туберкулиновой пробы.

Симультанная проба с применением туберкулинов для млекопитающих и для птиц нашла широкое применение во многих странах мира. На целесообразность её использования в качестве теста определения видовой специфичности аллергических реакций указывалось в резолюциях XVI(1948) и XVII (1950) генеральных сессий МЭБ.

В нашей стране симультанную пробу с использованием ППД для млекопитающих и комплексного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) внедрил в производство А.Н.Шаров в 1978 году. Первое Наставление по применению симультанной пробы с туберкулином и КАМ было утверждено ГУВ МСХ СССР 27.11.1978 г., впоследствии оно было пересмотрено и утверждено 04.07.1980 г. Методика проведения симультанной пробы с КАМ для практического применения при диагностике туберкулёза была утверждена ГУВ МСХ СССР 28.12.1981 г.

В настоящее время в нашей стране основным методом дифференциации неспецифических реакций является симультанная проба с ППД для млекопитающих и КАМ с учётом результатов симультанной пробы по группе реагирующих животных.

Основным недостатком симультанной пробы является небольшая её эффективность. Кроме того, в соответствии с Наставлением по её применению при выявлении реагирующих на туберкулин животных необходимо через 30 дней переисследовать всё стадо симультанной пробой с ППД для млекопитающих и КАМ. При этом учёт результатов симультанной пробы и оценку аллергических реакций следует проводить в целом по стаду или по группе исследуемых животных не менее 6 голов.

Проведение комплекса этих исследований довольно длительный и трудоёмкий процесс, так как приходится повторно переисследовать всё стадо двойной внутрикожной пробой в правой и левой средней трети шеи каждого животного. Тем более что в последние годы при групповом учёте симультанной пробы всё чаще стали получать неопределённые результаты.

Тем не менее, мы считаем, что главное достоинство симультанной пробы в том, что при её применении значительно сокращается количество реагирующих на туберкулин коров, многие реакции превалируют на КАМ или переходят на КАМ, то есть, в конечном счёте, как бы «сужается поиск» животных для диагностического убоя. Так, при применении симультанной пробы диагностическому

убою подлежат животные, реагирующие с большей интенсивностью реакции на ППД для млекопитающих, а при отсутствии таковых – реагирующие в равной степени на ППД и КАМ.

Проведённые нами многочисленные исследования по изучению возможности дифференциации неспецифических реакций показывают, что учёт результатов симультанной пробы с ППД для млекопитающих и КАМ можно проводить по группе животных с оценкой реакции по реактивному числу, а при получении неопределённых результатов исследований – проводить индивидуальный учёт по каждой корове.

Поэтому на основании представленных данных и собственных исследований мы предлагаем в целях контроля благополучия крупного рогатого скота по туберкулёзу проводить ежегодные исследования поголовья скота 2 раза в год (весной и осенью)внутрикожной пробой с ППД для млекопитающих. При выявлении в стаде реагирующих животных, дальнейшие исследования проводить с имультанной пробой.

Методика проведения и оценка результатов симультанной пробы с ППД для млекопитающих и КАМ.

– Проведение симультанной пробы допускается не ранее, чем через 30 дней после последней туберкулинизации животных.

– ППД для млекопитающих и КАМ вводят каждому животному внутрикожно, в дозе по 0,2 мл, с правой и левой стороны тела животных: крупному рогатому скоту – в симметричные участки шеи; быкам-производителям – в правую и левую подхвостовые складки.

– Предварительно места введения аллергенов выстригают и протирают ватными тампонами, смоченными 70^0 спиртом-ректификатом.

– Учёт и оценку результатов симультанной пробы проводят через 72 часа после введения аллергенов.

– При учёте результатов симультанной пробы у каждого исследуемого животного пальпируют место введения туберкулина. Реакцией считают любую припухлость в месте введения аллергена с

увеличением толщины кожной складки на 3 мм и выше, независимо от характера этой реакции (консистенции, температуры, болезненности и т.д.)

– Оценку результатов симультанной пробы проводят по индивидуальному учёту.

Оценка результатов симультанной пробы по индивидуальному учёту

Индивидуальную оценку интенсивности аллергических реакций проводят при наличии реагирующих животных на оба аллергена. Реакция на один из аллергенов считается более интенсивной, если при измерении утолщения кожной складки устанавливается разница не менее чем на 3 мм. Результаты оценки реакции на аллергены записывают в ведомость учёта симультанной пробы. В случаях, когда интенсивность аллергической реакции более сильно выражена на ППД туберкулин для млекопитающих, это животное считают подозреваемым в заражении возбудителем туберкулёза M.bovis или M.tuberculosis.

При более выраженной интенсивности аллергической реакции на КАМ, животное считают сенсибилизированным нетуберкулёзными микобактериями.

При отборе реагирующих животных для диагностического убоя, в первую очередь убивают реагирующих с большей интенсивностью реакции на ППД для млекопитающих, а при отсутствии животных с такими реакциями, диагностическому убою подвергают реагирующих животных с равными реакциями на оба аллергена.

Предлагаемая методика индивидуального учёта симультанной пробы предназначается в целях отбора животных для диагностического убоя.

Преимущества этой методики применения симультанной туберкулиновой пробы заключаются в том, что нет необходимости переисследовать симультанной пробой всё стадо. В связи с тем, что, в конечном счёте, диагноз на туберкулёз ставится только при подтверждении результатов аллергических исследований результатами убоя

реагирующих животных (при патологоанатомическом или лабораторном подтверждении). Следует считать, что симультанная проба применяется с целью отбора наиболее характерно реагирующих на ППД для млекопитающих животных для диагностического убоя. Поэтому можно сделать следующие выводы и заключение.

Выводы. При групповом учёте результатов симультанной пробы с ППД для млекопитающих и КАМ часто получают неопределённые результаты. Поэтому учёт и оценку этих исследований необходимо проводить индивидуально по каждой реагирующей корове.

Индивидуальную оценку интенсивности проявления аллергических реакций необходимо проводить при выявлении реагирующих животных на оба аллергена.

Реакцию на один из аллергенов следует считать более интенсивной, если устанавливается увеличение толщины кожной складки не менее 3 мм, т.е. если реакция на ППД для млекопитающих на 3 мм и более выше, чем на КАМ, животное следует считать подозреваемым в заражении M. bovis или M. tuberculosis. При более выраженной реакции (на 3 мм и выше) на КАМ – животное следует считать сенсибилизированным нетуберкулёзными микобактериями.

Заключение. Симультанную пробу с ППД для млекопитающих и КАМ следует применять в благополучных хозяйствах при выявлении реагирующих на туберкулин животных с целью отбора наиболее характерно реагирующих для диагностического убоя и последующих патологоанатомических и лабораторных исследований на туберкулёз.

Литература

1.Гулюкин М.И. Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных / М.И.Гулюкин, А.Х.Найманов, Н.П.Овдиенко[и др.]. –Москва, 2012. – 85 с.

2.Овдиенко Н.П. Совершенствование симультанной пробы с ППД туберкулином для млекопитающих и КАМ /Н.П.Овдиенко, А.Х.Найманов, П.Н. Помыканов[и др.]// Тезисы докл. науч. - практ. конф. «Основные научные иссл. по проблеме туберкулёза и бруцеллёза с.-х. ж-х». – Новосибирск, 1995. – С. 44.

3.Найманов А.Х. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симультанной пробы для дифференциальнойдиагностики туберкулёза крупного рогатого скота / А.Х.Найманов, Г.И.Устинова, Н.Г.Толстенко [и др.] // Ветеринария. – 2015. – № 6. – С. 20-25.

4.Найманов А.Х.Совершенствование симультанной туберкулиновой пробы для дифференциации неспецифических реакций у крупного рогатого скота/ А.Х.Найманов, Г.И.Устинова, Н.Г.Толстенко [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 1. – С. 11-13.

5.Найманов А.Х.Микобактериальные инфекциикрупного рогатого скота (туберкулёз и паратуберкулёз) / А.Х.Найманов, М.И.Гулюкин. – Москва :Зооветкнига, 2014. – 235 с.

6.Найманов А.Х. Туберкулёз животных / А.Х.Найманов, В.М.Калмыков. – Санкт-Петербург – Москва – Краснодар : Лань, 2018. – 504 с.

7.Помыканов Н.П. Совершенствование диагностики туберкулёза крупного рогатого скота в индивидуальных хозяйствах :автореф. дисс. канд. вет. наук. – Москва, – 2005. – 23 с.

8.Хасанов Н.Р. Совершенствование дифференциальной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота :дисс. канд. вет. наук. – Душанбе, 2001. – 105 с.

9. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулёза у животных: повышение её эффективности :дисс. докт. вет. наук. – Москва, 1989. – 373 с.

УДК 616.9:636.1:035.258

МЫТ ЛОШАДЕЙ, ОСЛОЖНЕННЫЙ ПЛЕСНЕВЫМИ И ТОКСИГЕННЫМИ ГРИБАМИ

Неустроев М.П., доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией ветеринарной биотехнологии, e-mail: mneyc@mail.ru,

Тарабукина Н.П., доктор ветеринарных наук, профессор, заведующая лабораторией по разработке микробных препаратов, e-mail: hotubact@mail.ru,

Петрова С.Г. кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории ветеринарной биотехнологии, e-mail: sargy1970p@mail.ru,

Эльбядова Е.И. научный сотрудник, e-mail: elbyadova@bk.ru,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М.Г. Сафронова» (ФГБНУ ЯНИИСХ), г. Якутск, РФ, Якутская государственная сельскохозяйственная академия, конт./тел.: 8-924-461-65-95; 8-914-238-48-43

Аннотация. Проведено производственное испытание разных схем лечения на молодняке лошадей, заболевших мытом. При бактериологическом посеве смывов взятых из носовых полостей больных мытом жеребят выделенная культура Streptococcus equi загрязнена грибами рода Aspergillus и Mucor.

При лечении мыта, осложненного патогенными грибами эффективным оказался препарат «Сахабактисубтил», обладающий выраженными бактерицидными и антифунгальными свойствами по отношению к Streptococcus equi и микроскопическим грибам рода Aspergillus и Mucor.

Ключевые слова: мыт, смывы, плесневые и токсигенные грибы.

HORSE STRANGLES COMPLICATED BY MOLDY AND TOXYGENIC FUNGI

Neustroev, M.P., Tarabukina, N.P., Petrova, S.G., Elbyadova, E.I.,
Federal State Budgetary Scientific Institution "Yakut Scientific Research Institute of Agriculture named after M.G. Safronov" (FSBSI YSRIA), 677001, Yakutsk, Russian Federation, tel.: 8-924-461-65-95; 8-914-23-84-843

Annotation: There were carried out the production test of different treatment regimens for young horses that have fallen ill with a horse strangles. In bacteriological culture of washings taken from the nasal cavities of foals with horse strangles, the isolated culture of Streptococcus equi is contaminated with fungi of the genus Aspergillus and Mucor.

The preparation "Sakhabactisubtil" was effective in the treatment of the horse strangles, complicated by pathogenic fungi, which has pronounced bactericidal and antifungal properties in relation to Streptococcus equi and microscopic fungi of the genus Aspergillus and Mucor.

Key words: strangles, washing , moldy and toxygenic fungi

Табунное коневодство одна из основных отраслей животноводства в Республике Саха (Якутия). К основным сдерживающим развитие отрасли факторам можно отнести инфекционные болезни лошадей. Из них наиболее распространен мыт лошадей, которая регистрируется ежегодно почти во всех коневодческих хозяйствах республики. Заболевают преимущественно молодняк лошадей 6-12-месячного возраста. В эпизоотическом очаге заболеваемость мытом может составлять 75-80 %, летальность может достигать до 22 % от числа заболевших. Экстремальные природно-климатические условия тебеневки, снижение иммунобиологической реактивности организма лошадей в зимне-весенний периоды, длительная выживаемость возбудителя болезни во внешней среде способствуют значительному

распространению инфекции [1]. Высокий уровень заболеваемости молодняка регистрируется в ноябре-феврале месяцах. Неполноценное кормление, смена типа кормления в зимнее время способствуют снижению резистентности организма жеребят в этот период. Влияние качества подаваемого корма на течение мыта так же отмечает А.А. Воронежцев (1954) [2]. По данным А.Д Жиркова (2014) в зависимости от метеорологических условий, в особенности в дождливые годы в растительности тебеневочных пастбищ Якутии значительно распространены микроскопические грибы рода Mucor, Aspergillus и Fusarium [3, 4].

Проведение эффективных мер профилактики и лечебных мероприятий имеет важное значение в борьбе с мытом лошадей. Для лечения заболевших животных обычно применяют антибиотики. Нами проведено производственное испытание разных схем лечения у больных мытом жеребят на участке «Туннук Анна» Намского улуса. У 24 голов заболевших мытом молодняка лошадей наблюдалось гнойное истечение из носовых ходов, увеличение подчелюстных лимфоузлов в размере, у некоторых произошло вскрытие абсцессов подчелюстного лимфоузла с выделением гнойного кровянистого экссудата. У животных отмечалось снижение аппетита, фыркание с разбрызгиванием содержимого носовых ходов, истощение, диарея. До начала лечения заболевших животных отделили от основного стада, взяли смывы с носовой полости и вскрывшихся абсцессов для лабораторных исследований.

При этом было отмечено, что в коневодческом хозяйстве для кормления жеребят использовали корма низкого качества. При визуальном осмотре кормов установлено поражение их плесневыми грибами. Поэтому так же взяты пробы сена для микологического исследования.

Предпосевную обработку посевного материала из носовых полостей жеребят проводили с применением 70^0 спирта с последующим промыванием 9 % физиологическом растворе. Выделение микроскопических грибов из кормов проведено непосредственным посевом на агаризованные среды. При микробиологическом исследовании смывов и корма все взятые пробы оказались контаминированы микроскопическими грибами рода Aspergillus и Mucor. При бактериологическом исследовании смывов, загрязненных с грибами с трудом выделили культуру возбудителя мыта Streptococcus equi серологической группы С.

Больных жеребят разделили на 2 аналогичные группы. Одной группе жеребят вводили интраназально 5 мл препарата «Сахабактисубтил» и внутримышечно в верхнюю треть шеи фугат из штамма бактерий Bacillus subtilis ТНП-3 в дозе 2 мл. Второй группе – антибиотик бициллин-5. Препараты вводили с интервалом 3 дня в течение 3 недель.

В процессе лечения у жеребят 1 группы с легкой формой увеличенные лимфоузлы стянулись, слизистое истечение из носовых ходов прекратилось. А у жеребят с тяжелой формой течения болезни абсцессы созрели и вскрылись с выделением сливкообразного желтого гноя, клиническое состояние значительно улучшилось, истечение из носовых ходов стало серозно-слизистым, аппетит улучшился. Клиническое состояние жеребят 2 группы также улучшилось, но раневая поверхность вскрывшихся абсцессов медленно заживает, наблюдается гнойно-слизистое истечение из носовых ходов. В конце 3 недели лечения также проводили повторное взятие смывов с носовых ходов жеребят. При исследовании смывов с носовой полости от жеребят, получавших препарат «Сахабактисубтил» и фугат из штамма бактерий Bacillus subtilis ТНП-3 плесневых и токсигенных грибов не выделено. На бактериологических посевах преобладает рост споро-

образующих аэробных бактерий рода Bacillus. В смывах от жеребят, которым вводили бициллин-5 также обнаруживаются грибы рода Aspergillus и Mucor. Поэтому в конце 3 недели им назначили интраназально препарат «Сахабактисубтил» внутримышечно фугат из штамма бактерий Bacillus subtilis ТНП-3. В итоге жеребята обеих групп выздоровели, падежа среди молодняка не зафиксировано.

В зависимости от метеорологических условий, при применении кормов низкого качества мыт лошадей в условиях Якутии может осложняться плесневыми и токсигенными грибами рода Aspergillus и Mucor. Такая сочетанная инфекция способствует проявлению тяжелой формы болезни, требует подбора лекарственных препаратов при лечении, затрудняет выделение чистой культуры возбудителя. Результаты производственного испытания показали, что препараты с выраженным бактерицидным и фунгицидными свойствами при сочетанной инфекции наиболее эффективны, чем антибиотикотерапия.

Литература

1.Неустроев М.П. Мыт лошадей в Якутии / РАСХН. Сиб. отд-ние. Якут. НИИСХ. – Новосибирск, 2000.-44 с.

2.Воронежцев А.А. Влияние качественно различного кормления на проявление и течение мытной инфекции у лошадей: автореферат дисс.. канд. вет. наук. – М., 1954.-16 с.

3.Жирков А.Д., Татаринова С.С., Тарабукина Н.П., Неустроев М.П. Фунгицидная активность штаммов бактерий Bacillus subtilis по отношению к токсигенным грибам // Аграрный вестник Урала. – 2013,-№7.-С.20-21.

4.Жирков А.Д. Профилактика микотоксикозов лошадей табунного содержания с применением пробиотика Сахабактисубтил в условиях Якутии. Автореферат дисс… канд. вет. наук. – Новосибирск, 2015, 19 с.

УДК 619:616.992.28/099

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В КОРМАХ ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ В САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ИХ КАЧЕСТВА

Пирязева Е.А., канд. биолог. наук, старший научный сотрудник Лаборатория микотоксикологии и санитарии кормов, piryazeva01@yandex.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиал ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН» 123022, г. Москва, РФ, т. 8-499-256-35-81

В статье представлены результаты изучения пораженности 333 проб комбикормов, сырья для их производства, а также 628 - грубых, сенажированных и силосованных кормов видами грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, семейства Mucoraceae. Согласно полученным данным все изученные корма интенсивно контаминированы аспергиллами и пенициллами, при этом в комбикормах и сырье для их производства чаще выявляли виды *P. cyclopium*, *P martensii*, *P. urticae*, *P. chrysogenum*, *P. palitans*, *P. viridicatum*, *A. flavus*, и *A. candidu*s, в сене - *P. cyclopium*, *A. flavus* и *A. niger*, в сенаже и силосе - *P. roqueforti* и *A. fumigatus*.

Мукоровые грибы, распространенность которых изучали в комбикормах и сырье для их производства, обнаруживали реже, преимущественно в комбикормах (58,5%), доминировали *M. racemosus* и *M. hiemalis.* Виды рода *Scopulariopsis,* главным образом S. *brevicaulis,* встречались в этих видах кормов еще реже, в единичных пробах идентифицировали *Trichoderma,* чаще всего *T. koningii.*

Отмечена широкая распространенность в зерне (73,3%) и комбикормах (63,2%) грибов рода *Alternaria* (*A. alternata* и *A. tenuissima*); в сене (71,5%) — *Fusarium* (*F. sporotrichioides*). В 29,0% проб сенажа и 34,2% проб силоса выявляли термотолерантный гриб *B. nivea.*

Ключевые слова: корма, контаминация, санитарно-показательная микобиота.

THE PREVALENCE OF FUNGI RELATED TO SANITARY AND MYCOLOGICAL ASSESSMENT OF THEIR QUALITY

Piryazeva E.A., piryazeva01@yandex.ru

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center – K. I. Skryabin, Ya. R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences». 123022, Moscow, Russian Federation, 8(499)256-80-31

Summary. The article presents the results of the study of the prevalence of 333 samples of feed, raw materials for their production, as well as 628 - coarse, haylage and silage species of fungi genera *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Alternaria, Scopulariopsis, Trichoderma*, family Mucoraceae. According to the obtained data, all investigated feed intensively contaminated with Aspergillus and Penicillium, while in compound feeds and raw materials for their production was frequently detected species as P. *cyclopium, P martensii, P. urticae, P. chrysogenum, P. palitans, P. viridicatum, A. flavus, A. candidus*, in hay - *P. cyclopium, A. flavus* and A. *niger*, haylage and silage*, P. roqueforti* and *A. fumigatus*.

Mucoraceous molds, the prevalence of which was studied in compound feeds and raw materials for their production, were found less frequently, mainly in compound feeds (58,5%), dominated by *M. racemosus and M. hiemalis.* Species of the genus *Scopulariopsis*, mainly *S. brevicau-*

lis, were found in these types of feed even less frequently; *Trichoderma* was identified in single samples, most often *T. koningii*. Widespread in grain (73,3%) and compound feeds (63,2%) of fungi of the genus *Alternaria (A. alternata and A. tenuissima*) was noted; in hay (71,5%) - *Fusarium (F. sporotrichioides).* In 29,0 % of samples of haylage and 34,2% of the samples of silage were detected thermotolerant fungi *B. nivea*.

Key words: feed, contamination, sanitary-indicative of mycobiota.

Пораженность кормов растительного происхождения грибами может представлять серьезную опасность для здоровья животных в связи с присутствием в них вторичных метаболитов - микотоксинов, которые могут накапливаться как во время вегетации растений, так и в период хранения кормов. Видовой и количественный состав микобиоты свежеубранных кормов зависит от почвенно-климатических условий региона произрастания, также имеет значение и вид растения. Во время хранения эпифитная микобиота, а также факультативные паразиты растений (в частности, представители родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*) постепенно вытесняется «плесенями хранения», к которым в первую очередь относят грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, семейства Mucoraceae. Особенно интенсивно этот процесс происходит при нарушении условий уборки, хранения, транспортировки, а также технологии производства кормов.

В связи с вышеизложенным в комплексе мероприятий по профилактике микотоксикозов и микозов животных решающее значение имеет ветеринарно-санитарный контроль кормов, который включает в том числе обобщенные данные о видовом составе основных контаминантов кормовой продукции, позволяющие составить научно обоснованный прогноз контаминации кормов микромицетами.

В период 1991-2005 гг. мы провели изучение пораженности грибами рода *Fusarium* 2479 проб свежеубранного зерна из хозяйств 39 республик, краев и областей 8 зернопроизводящих регионов РФ,

по результатам которого получены данные о копмлексах доминантных видов этих грибов в каждом из исследованных регионов.

В настоящей работе представлены результаты многолетних мониторинговых исследований пораженности комбикормов, сырья для их производства, а также грубых и сочных кормов токсинообразующими грибами, имеющими значение в санитарно-микологической оценке их качества.

Материалом для изучения являлись 174 пробы зерна и продуктов его переработки (пшеница, ячмень, овес, рожь, кукуруза, отруби пшеничные); 11 - кормовых добавок и премиксов, 28 - жмыхов и шротов, 11 - муки животного происхождения, 109 — комбикормов, 628 - грубых, сенажированных и силосованных кормов.

Микологическое исследование включало первичное выделение грибов из состава общей микобиоты кормов, выделение их в чистые культуры, видовую идентификацию.

Микологический анализ зерна и продуктов его переработки показал значительную их пораженность пенициллами (58 проб из 65 исследованных, 89,2%), аспергиллами (36/41, 87,8%), альтернариями (55/75, 73,3%); представителей семейства Mucoraceae обнаруживали реже (11/31, 35,5%); еще реже выявляли виды *Scopulariopsis* (6/34, 17,6%) и эпизодически - *Trichoderma* (1/34, 2,9%).

Среди *Penicillium* (табл. 1) доминировали виды *P. martensii* Biourge (в 40,0% проб от общего числа исследованных), *P. cyclopium* Westl. (33,8%), *P. urticae* Bain. (24,6%) и *P. viridicatum* Westl. (20,0%). Кроме того, обнаруживали виды *P. chrysogenum* Thom, *P. palitans* Westl., *P. brevi-compactum* Dierckx, *P. granulatum* Bain. и *P. corymbiferum* Westl., хотя и значительно реже - в 10,8%, 9,2%, 9,2%, 7,7%, 7,7% проб соответственно. В единичных случаях выявляли *P. janthinellum* Biourge, *P. meleagrinum* Biourge, *P. purpurogenum* Stoll, *P. lanosum* Westl., *P. aurantio-virens* Biourge, *P. pulvillorum* Tufitt, *P.*

vinaceum Gilman et Abbott, *P. exspansum* Link, *P. crustosum* Thom и *P. puberulum* Bain.

В составе *Aspergillus* в зерне широко распространен *A. flavus* Link (73,2%), затем следовал *A. candidu*s Link (39,0%), реже выявляли *A. amstelodami* (Mangin) Thom & Church (21, 95%), *A. versicolor* (Vuill.) Tiraboschi (21,95%), *A. wentii* Wehmer (19,5%), *A. niger* Van Tieghem (17,1%), *A. pseudoglaucus* Blochwitz (17,1%), *A. ochraceus* Wilhelm (12,2%), эпизодически - *A. fumigatus* Fresenius (7,3%), *A. nidulans* (Eidam) Wint. (7,3%), *A. terreus* Thom (4,9%), а также *A. chevalieri* (Mangin) Thom & Church, *A. sydowi* (Bain. & Sart.) Thom & Church, *A. sclerotiorum* Huber, *A. alliaceus* Thom & Church и *A. clavatus* Desmazières - каждый в 2,4% проб.

Мукоровые грибы чаще представлены *Mucor racemosus* Fres. (25,8% проб), а *M. hiemalis* Wehmer, *Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. et Trott. и *Rhizopus nigricans* Ehrenb. присутствовали в единичных пробах. Отмечена незначительная контаминация проб зерна двумя видами рода *Scopulariopsis* - *S. brevicaulis* (Sacc.) Bain.(14,7%) и *S. brevicaulis* var. *alba* Thom (2,9%), а также одним - *Trichoderma: T. koningii* Oudem. (2,9%).

Приблизительно с одинаковой частотой выявляли в зерне два вида рода *Alternaria – A. tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wiltshire (38,7%) и *A. alternata* (Fr.) Keissl. (34,7%), значительно меньше распространены виды группы *A. infectoria* (16%). Работа по поиску грибов этого рода в различных видах кормов, в том числе зерновых, продолжается.

Исследование проб кормовых добавок, премиксов, жмыхов, шротов, глютенов и муки животного поисхождения показало высокую степень (83,3-92,3%) пораженности их пенициллами и аспергиллами. Всего установлено 23 вида грибов рода *Penicillium*, среди которых наибольшее распространение в жмыхах и шротах имели *P.*

cyclopium (13 проб), *P. chrysogenum* (9), а также *P. palitans* (7), *P martensii* (5) и *P. viridicatum* (3); в муке животного происхождения - *P. palitans* (3 пробы); в кормовых добавках и премиксах - *P. cyclopium* (5 проб), *P. palitans* (5), *P martensii* (3) и *P. urticae* (3). Анализ соотношения 15 идентифицированных видов *Aspergillus* в комплексе контаминантов по типу сырья показал, что в жмыхах и шротах доминировал *A. flavus* (16 проб), значительно реже выявляли *A. versicolor* (5), *A. amstelodami* (4), *A. pseudoglaucus* (3), *A. chevalieri* (3), *A. fumigatus* (3), *A. ochraceus* (2), *A. nidulans* (2), *A. terreus* (1), *A. proliferans* Smith (1), *A. candidus* (1) и *A. sydowi* (1). В муке животного происхождения незначительно доминировал *A. candidus* (6 проб), остальные виды - *A. amstelodami*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. flavus* var. *columnaris* Raper et Fennell, *A. chevalieri*, *A. niger* - обнаруживали приблизительно с одинаковой частотой (в 1-3 пробах). В кормовых добавках и премиксах чаще определяли *A. flavus* (6 проб), несколько реже - *A. pseudoglaucus* (4), *A. amstelodami* (3), *A. candidus* (3), в единичных пробах - *A. versicolor* (2), *A. chevalieri* (1), *A. niger* (1), *A. fumigatus* (1), *A. ochraceus* (1), *A. terreus* (1) и *A. wentii* (1).

Таблица 1. Доминантные виды грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, семейства Mucoraceae в комбикормах и сырье для их производства

Вид корма	Доминантные виды
Зерно (174 пробы)	*Penicillium martensii* (40,0%), *P. cyclopium* (33,8%), *P. urticae* (24,6%), *P. viridicatum* (20,0%); *Aspergillus flavus* (73,2%), *A. candidus* (39,0%); *Alternaria tenuissima* (38,7%), *A. alternata* (34,7%), *Mucor racemosus* (25,8%), S*copulariopsis brevicaulis* (14,7%), *Trichoderma koningii* (2,9%)
Кормовые добавки, премиксы (11 проб)	*P. cyclopium* (5 проб), *P. palitans* (5), *P martensii* (3), *P. urticae* (3); *A. flavus* (6), *A. pseudoglaucus* (4), *A. amstelodami* (3), *A. candidus* (3); *M. racemosus* (1);,*A. corymbifera* (1); S. *brevicaulis* (2)
Жмыхи, шроты, глютены (28 проб)	*P. cyclopium* (13 проб), *P. chrysogenum* (9), *P. palitans* (7), *P martensii* (5), *P. viridicatum* (3); *A. flavus* (16)*; M. racemosus* (5), *M. hiemalis* (3); S. *brevicaulis* (14); *T. viride* (1)
Мука животного происжождения (11 проб)	*P. palitans* (3 пробы); *A. candidus* (6); *A. amstelodami* (3), *A. terreus* (3); *M. hiemalis* (3); S. *brevicaulis* (1), S. *brevicaulis* var. *alba* (1); *T. atroviride* (1), *T. koningii* (1)
Комбикорма (109 проб)	*P. urticae* (48,6%), *P. cyclopium* (35,1%), *P martensii* (29,7%); *A. flavus* (71,4%), *A. candidus* (42,9%); *A. alternata* (31,6%), *A. tenuissima* (26,3%); *M. racemosus* (25,6%), *M. hiemalis* (20,7%); S. *brevicaulis* (14,6%); *T. koningii* (3,4%)

Представители семейства Mucoraceae в большей степени контаминировали пробы жмыхов и шротов (в 8 из 19 исследованных), при этом доминировали виды рода *Mucor*: *M. racemosus* (5) и *M. hiemalis* (3), кроме того, присутствовали *R. nigricans* (2) и *A. corymbifera* (1). Приблизительно с такой же частотой обнаруживали мукоровые грибы в пробах муки животного происхождения (в 4 из 11), однако, состав их был более разнообразен: *M. hiemalis* (3), *R. nigricans* (2), *M. janseni* Lendn. (1), *M. plumbeus* Bonord. (1), *M. racemosus* (1) и *A. co-*

rymbifera (1). В кормовых добавках всего в одной пробе выявлены *M. racemosus* и *A. corymbifera* .

Микологический анализ 28 проб жмыхов, шротов и глютенов показал, что половина из них (14) поражены S. *brevicaulis.* Этот же вид контаминировал две пробы из восьми изученных кормовых добавок и одну (из 13) — муки животного происхождения, в которой, также в одной пробе, присутствовал и S. *brevicaulis* var. *alba.*

Виды рода *Trichoderma* обнаруживали редко — всего в трех пробах: *T. viride* Pers. выявлена в пробе соевого жмыха, *T. atroviride* P. Karst. – в пробе рыбной муки и *T. koningii* – в пробе костной муки.

Пораженность вышеперечисленных кормов грибами рода *Alternaria* не изучали.

По результатам исследований комбикормов можно сделать заключение о чрезвычайно высокой (более 90%) степени пораженности их микромицетами родов *Penicillium* (34 из 37 исследованных) и *Aspergillus* (32 из 35), широкой распространенности *Alternaria* (63,2%, в 24 из 38) и мукоровых грибов (58,5%, в 48 из 82), умеренном присутствии (14,6%, в 13 из 89) единственного представителя рода *Scopulariopsis* - S. *brevicaulis* и редком обнаружении *Trichoderma* (3,4%, в 3 из 89), также представленного одним видом - *T. koningii*.

Наиболее распространены среди 16 идентифицированных видов пенициллов *P. urticae* (48,6% проб от числа исследованных), *P. cyclopium* (35,1%) и *P martensii* (29,7%), реже отмечали *P. palitans* (18,9%), *P. corymbiferum* (16,2%), *P. chrysogenum* (13,5%), *P. granulatum* (13,5%), *P. puberulum* (10,8%), *P. lanosum* (8,1%), в единичных случаях - *P. aurantio-virens, P. brevi-compactum*, *P. canescens* Sopp, *P. janthinellum*, *P. meleagrinum*, *P. oxalicum* Currie et Thom и *P. steckii* Zaleski.

Из 12 выявленных видов аспергиллов чаще всего встречались *A. flavus* (71,4%) и *A. candidus* (42,9%), менее распространены *A. niger* (28,6%), *A. amstelodami* (25,7%), *A. wentii* (14,3%), *A. versicolor* (11,4%), *A. pseudoglaucus* (11,4%), *A. fumigatus* (8,6%), в единичных пробах - *A. ochraceus*, *A. chevalieri*, *A. nidulans* и *A. flavus* var. *columnaris*.

Род *Alternaria* представлен двумя видами: *A. alternata* и *A. tenuissima*, встречающимися с примерно одинаковой частотой — в 31,6% и 26,3% проб соответственно.

Среди представителей семейства Mucoraceae чаще всего выявляли виды рода *Mucor* (43,9%, в 36 пробах из 82 изученных), при этом наибольшую распространенность имели *M. racemosus* (25,6%) и *M. hiemalis* (20,7%), в одной пробе присутствовали *M. globosus* Fischer *M. griseo-ochraceus* Naumov. Виды родов *Absidia* (*A. corymbifera*) и *Rhizopus* (*R. nigricans*) отмечали в 7,3% и 12,2% проб соответственно.

Изучение микобиоты 239 проб грубых кормов (сено, солома) из Московской области показало значительную пораженность их пенициллами, аспергиллами и фузариями — 54,4%, 60,25% и 71,5% соответственно.

Среди *Penicillium* (табл. 2) обнаружены представители 28 видов, при этом наибольшую распространенность имел вид *P. cyclopium* (в 16,7% проб от числа исследованных). Виды *P. brevicompactum* (10,5%), *P martensii* (8,4%), *P. chrysogenum* (7,9%), *P. palitans* (6,3%) и *P. exspansum* (6,3%) выявляли реже (табл. 2). В немногочисленных пробах обнаруживали *P. roqueforti* Thom (3,8%), *P. aurantio-virens* (2,9%), *P. urticae* (2,5%), *P. stoloniferum* Thom (2,1%), *P. cyclopium* var. *echinulatum* n. var. (1,7%), *P. viridicatum* (1,3%), *P. puberulum* (1,3%), *P. implicatum* Biourge (1,3%). Остальные виды, такие как *P. nigricans* (Bain.) Thom, *P. crustosum*, *P. commune* Thom, *P. corymbiferum*, *P. paxilli* Bainier, *P. simplicissimum* (Oid.) Thom, *P. cya-*

neo-fulvum Biourge, *P. oxalicum*, *P. meleagrinum*, *P. frequentans* Westling, *P. granulatum*, *P. janthinellum* и *P. steckii*, - в единичных случаях.

Таблица 2. Доминантные виды грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus, Fusarium, Byssochlamys* в сене, сенаже и силосе

Вид корма	Доминантные виды
Сено (239 проб)	*P. cyclopium* (16,7%); *A. flavus* (35,1%), *A. niger* (34,7%); *F. sporotrichioides* (61,1%)
Сенаж (193 пробы)	*P. roqueforti* (60,1%); *A. fumigatus* (46,1%); *B. nivea* (29,0%); *F. sporotrichioides* (1,6%)
Силос (196 проб)	*P. roqueforti* (63,8%); *A. fumigatus* (50,0%); *B. nivea* (34,2%)

Из 15 идентифицированных видов *Aspergillus* наиболее частыми контаминантами являлись два: *A. flavus* (35,1%) и *A. niger* (34,7%); значительно реже обнаруживали *A. versicolor* (10,5%), *A. pseudoglaucus* (19,6%), *A. ochraceus* (9,6%), *A. wentii* (9,6%), *A. amstelodami* (7,1%), *A. nidulans* (3,8%), *A. tamarii* Kita (2,1%), *A. candidus* (2,1%) и *A. fumigatus* (1,7%). В единичных пробах присутствовали *A. sydowi*, *A. terreus* и *A. chevalieri*.

Определено 8 видов рода *Fusarium*, среди которых абсолютно доминировал *F. sporotrichioides* Sherb. (в 61,1% проб от числа исследованных), в значительно меньшей степени поражали сено виды *F. tricinctum* (Corda) Sacc. (10,9%), *F. avenaceum* (Corda ex Fr.) Sacc. (7,9%), *F. poae* (Peck) Wr. (5,9%), *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. (1,7%) и *F. graminearum* Schw. (1,7%). Очень редко (в 1-2 пробах) выявляли *F. semitectum* Berk. et Rav. и *F. solani* (Mart.) Sacc.

Сенажированные и силосованные корма традиционно считаются неблагоприятной средой для развития грибов, однако, при нарушении условий заготовки, хранения, выемки наблюдается интенсивная контаминация их токсигенными и патогенными микромицетами. Кроме того, даже при минимальном содержании кислорода в кормах, что характерно для сенажа и силоса хорошего качества, возможно развитие микроаэрофильных грибов, к которым относятся, в частности, *Byssochlamys nivea* Westling и *P. roqueforti* Thom.

Микологическим исследованием 193 проб сенажа и 196 проб силоса из Московской области установлена высокая степень пораженности их пенициллами и аспергиллами.

Грибы рода *Penicillium* обнаружены в 68,9% проб сенажа и в 73,5% проб силоса., при этом как в сенаже, так и в силосе доминировал вид *P. roqueforti* – в 60,1% и 63,8% проб от числа исследованных соответственно. Такие виды как *P. cyclopium*, *P. urticae*, *P. chrysogenum* и *P martensii* обнаруживали значительно реже — в 0,5-4,7% проб. В сенаже также выявляли *P. brevi-compactum* (1,5% проб), *P. aurantio-virens* (0,5%) и *P. palitans* (0,5%), в силосе - *P. viridicatum* (0,5%) и *P. notatum* Westling (0,5%).

Более половины изученных проб сенажа и силоса контаминированы *Aspergillus* – 63,2% и 59,2% проб соответственно, среди которых преимущественное распространение имел вид *A. fumigatus*, обнаруженный в 46,1% проб сенажа и 50,0% - силоса. В значительно меньшем количестве выявляли *A. pseudoglaucus* - в 13,5% проб сенажа и 7,1% проб силоса, остальные виды, такие как *A. candidu*s, *A. niger*, *A. nidulans,* *A. amstelodami*, *A. flavus*, *A. chevalieri*, *A. versicolor*, *A. repens* De Bary и *A. wentii* отмечали редко — в 0,5-4,7% проб, при этом в сенаже был более разнообразный (11 видов), чем в силосе (8 видов) видовой состав.

Микроаэрофильный гриб *B. nivea*, более типичный для консрвированных кормов с высоким уровнем влажности, обнаружен в 29,0% проб сенажа и 34,2% - силоса.

Род *Fusarium* представлен одним видом *F. sporotrichioides*, встречающимся в единичных пробах сенажа (1,6%), в силосе эти грибы не идентифицировали.

УДК 619:616.34:636.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОТИПОВ И ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ ДИАРЕЕГЕННЫХ *E.COLI*

Поболелова Ю.И., к.х.н. с.н.с.

Яцентюк С.П.*, к.б.н. зав. отд. ГИБЖ *E-mail: pcr-lab@vgnki.ru

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, 123022, Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, Россия, тел. (499) 941-01-51

АННОТАЦИЯ. Выявление диареегенных *Escherichia coli,* дифференциация их от непатогенных бактерий является важной задачей. Проведено патотипирование 68 музейных штаммов *E.coli* с использованием метода ПЦР. ЭТКП оказалась наиболее распространённым патотипом *E.coli* (29% штаммов), 15% штаммов идентифицированы как ЭПКП, 13% - ШТКП, 9% - ЭИКП. ЭАКП и ДАКП не были выявлены в процессе исследования. Кроме того, у 11 образцов обнаружено присутствие генов одновременно двух факторов вирулентности.

В работе проведено изучение наличия у штаммов *E.coli* генов антибиотикорезистентности. Идентификацию проводили по фрагментам генов, определяющих устойчивость бактерий к бета-лактамам (гены blaTEM, blaSHV), хлорамфениколу (гены cat1, cmlA), стрептомицину (ген aadA1), флорфениколу (ген FloR) и гентамицину (ген aac3-IV). 36% исследованных образцов содержали гены устойчивости хотя бы к одному из исследованных антибиотиков, 5 штаммов были устойчивы к 2-м антибиотикам.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, патотипы, антибиотикорезистентность, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

IDENTIFICATION OF PATOTYPES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES OF MUSEUM STRAINS OF DIARRHEAGENIC *E.COLI*

Pobolelova Yu.I., Yatsentyuk S.P.* *E-mail: pcr-lab@vgnki.ru
The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 123022, Zvenigorodskoe shosse, 5, Moscow, Russia

ABSTRACT. The detection of diarrheagenic *Escherichia coli* and its differentiation from non-pathogenic bacteria is a significant problem. PCR pathotyping of 68 *E.coli* museum strains was carried out. ETEC was the most prevalent pathotype (29% strains), 15% strains were identified as EPEC, 13% - STEC, 9% - EIEC. EAEC and DAEC were not detected. 11 isolates were found to carrying two pathogenic genes simultaneously.

The strains were also characterized by the presence of antibiotic resistance genes. Genes determining the resistance to beta-lactams (blaTEM, blaSHV genes), chloramphenicol (cat1, cmlA), streptomycin (aadA1 gene), florfenicol (FloR gene) and gentamicin (aac3-IV gene) were analyzed. 36% of strains carried resistance genes to one of the antibiotics and five strains - to 2 antibiotics.

Key words: *Escherichia coli,* pathotyping, antibiotic resistance, polymerase chain reaction (PCR).

Escherichia coli – грамотрицательная палочка, представитель семейства Enterobacteriaceae. *E. coli* является неотъемлемым обитателем кишечника здоровых животных. Комменсальные штаммы кишечной палочки редко вызывают заболевания, однако некоторые штаммы *E. coli* приобрели специфические факторы вирулентности, которые позволяют хорошо адаптироваться в новых нишах обитания и вызывать широкий спектр заболеваний, самым распространённым

из которых является кишечная инфекция [1]. Среди *E.coli*, вызывающих кишечные инфекции, выделяют шесть категорий: Энтеротоксигенные кишечные палочки (ЭТКП), Энтеропатогенные кишечные палочки (ЭГКП), Энтерогеморрагические кишечные палочки (ЭГКП), Энтероаггрегативные кишечные палочки (ЭАКП), Энтероинвазивные кишечные палочки (ЭИКП), Диффузно-адгезивные кишечные палочки (ДАКП).

ЭТКП чаще всего вызывают диарею сельскохозяйственных животных, продуцируя термолабильный токсин (heat-labile toxin - LT) и термостабильный токсин (heat-stable toxin - ST). Штаммы *E. coli* могут производить один или оба данных энтеротоксина. Все энтеротоксины активируют секрецию электролитов и воды. Чрезмерная секреция приводит к обезвоживанию и возможной смерти [2].

ЭПКП характеризуются близкой адгезией бактерий к мембранам эпителиальных клеток и стиранием микроворсинок тонкого кишечника. Ген интимина, отвечающего за адгезию, кодируется особым хромосомным участком - локусом «стирания энтероцитов», который не встречается у *E.coli* нормальной флоры кишечника.

ЭГКП являются причиной геморрагического колита, основным фактором вирулентности у этих штаммов является способность образовывать шигаподобные веротоксины. Такие штаммы также выделяют в группу шига-токсин продуцирующих *E. coli* (ШТКП).

Критерий, определяющий ЭАКП – аггрегационная адгезия, в которой основную роль играют адгезины AAFI и AAFII, экспрессия которых кодируется aggR геном [3].

ЭИКП биохимически и генетически похожи на *Shigella spp*. Идентификацию ЭИКП часто проводят по гену активатора транскрипции (VirB).

На поверхности ДАКП имеются фибрии, гены которых гомологичны бактериальным адгезинам DR типа (гены DaaC, DaaD).

Диареегенные *E.coli* были первыми патогенами, для которых были разработаны быстрые и надежные методы молекулярной диагностики [4]. Механизмы вирулентности, характеризующие пататипы *E.coli* генетически кодируются хромосомной, плазмидной и фаговой ДНК и представлены следующими генами: ST, LT (ЭТКП), stx1/ stx2 (ШТКП), eae (ЭПКП), agg R (ЭАКП), invE/VirB (ЭИКП), DaaD (ДАКП).

E.coli широко используется для мониторинга антимикробной резистентности у сельскохозяйственных животных. Основные антибиотики, к которым проявляет устойчивость *E.coli*: ампициллин, амоксициллин (бета-лактамы), цефтиофур, стрептомицин, гентамицин, канамицин (аминогликозиды), хлорамфеникол, флорфеникол. Быстрым и надежным методом характеристики штаммов по наличию генов устойчивости к антибиотикам является метод ПЦР.

Материалы и методы исследования. Работа проводилась с использованием штаммов *Escherichia coli* коллекции ФГБУ «ВГНКИ». Выделение ДНК проводили набором «Рибо-преп» (Amplisens, ФБУН ЦНИИЭ) согласно инструкции.

Определение патотипа *E.coli* и идентификацию генов устойчивости к антибиотикам проводили методом ПЦР. Для проведения молекулярного анализа *E.coli* использовали 14 пар праймеров. Последовательности праймеров для амплификации генов ST, LT, eae, aggR, invE, DaaD указаны в [5], для шига-токсинов stx1 и stx2 в [6], для детерминант антибиотикорезистентности (АБР) в [7]. Первоначально все праймеры были проверены отдельно в моноплексных реакциях. Амплификацию генов, кодирующих факторы вирулентности (ФВ), проводили в процессе двух мультиплексных (ST, LT, DaaD; aggR, invE, eae) и двух моноплексных ПЦР (stx1/2). Амплификацию генов антибиотикорезистентности (АБР) проводили в процессе двух мультиплексных (SHV, Cat, FloR, AadA1 и TEM; CmlA, Aac-3-IV). Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «Тер-

цик». Детекцию продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в агарозном геле.

Результаты и их обсуждение. Было исследовано 68 музейных штаммов *E.coli*, выделенных в период с 1956 по 1988 гг. Результаты определения патотипа *E.coli* представлены в таблице 1. Согласно литературным данным, ЭТКП является самым распространённым патотипом *E.coli* [4, 5]. По результатам нашего анализа ЭТКП также является наиболее часто встречающимся патотипом (у 29 % процентов образцов выявлен ген одного или двух энтеротоксинов ST/LT). Количество выявленных ЭПКП, ЭИКП, ШТКП было примерно одинаковым (9-15%). ЭАКП и ДАКП среди исследованных штаммов не обнаружены. Случаи выявление ДАКП действительно чрезвычайно редко описаны в литературе, в то время как ЭАКП выявляют довольно часто [3-5].

Таблица1. Идентификация генов факторов вирулентности *E.coli* и частота их встречаемости среди исследованных музейных штаммов

Патотип	Ген	Количество штаммов	Частота встречаемости, %
ЭТКП	ST	11	16
	LT	9	13
ЭПКП	Eae	10	15
ЭИКП	InvE	6	9
ШТКП	Stx1	2	3
	Stx2	7	10
ЭАКП	AggR	0	0
ДАКП	DaaD	0	0

У 16% образцов наблюдалось присутствие одновременно двух генов факторов вирулентности: гены термолабильного и термостабильного токсинов (4 штамма), интимина и шига-токсинов (3 штамма), термостабильного токсина и интимина (2 штамма),

термолабильного токсина и интимина (1 штамм), термостабильного и шига-токсинов (1 штамм), двух шига-токсинов (1 образец).

Выявление факторов устойчивости к антибиотикам проводили методом ПЦР по фрагментам генов, определяющих устойчивость бактерий *E.coli* к бета-лактамам (гены blaTEM, blaSHV), хлорамфениколу (гены cat1, cmlA), стрептомицину (ген aadA1), флорфениколу (ген FloR) и гентамицину (ген aac3-IV). Результаты представлены в таблице 2. 24 из 68 исследованных образцов (36%) музейных штаммов содержали гены резистентности хотя бы к одному из перечисленных выше антибиотиков. Полученный результат согласуется с данными исследования антибиотикорезистентности коллекции музейных штаммов *Salmonella spp.*, опубликованными в 2011 году [8]. Среди изученных штаммов обнаружены образцы, несущие гены устойчивости к двум антибиотикам одновременно: стрептомицину и хлорамфениколу – 2 образца; стрептомицину и флорфениколу – 2 образца; флорфениколу и хлорамфениколу – 1 образец. Полученные результаты свидетельствуют о распространении устойчивости к нескольким антибиотикам в одном образце уже в первые десятилетия применения антибиотиков.

Таблица 2. Идентификация генов антибиотикорезистентности *E.coli* и частота их встречаемости среди исследованных музейных штаммов

Антибиотик	Ген АБР	Количество штаммов	Частота встречаемости, %
Бета-лактамы	blaTEM	0	0
	blaSHV	0	0
Хлорамфеникол	Cat1	3	4
	CmlA	4	6
Стрептомицин	AadA1	17	25
Флорфеникол	FloR	4	6
Гентамицин	aac3-IV	0	0

Заключение. Охарактеризованы музейные штаммы *E.coli* коллекции ВГНКИ. Показана возможность использования методики ПЦР для дифференциации диареегенных кишечных палочек от непатогенных бактерий, определения патотипа *E.coli* а также выявления генов антибиотикорезистентности.

Литература

1. Рябкова Е.Л., Иванчик Н.В., Сухорукова М.В., Щебников А.Г., Решедько Г.К. Резистентность нозокомиальных штаммов Escherichia coli в стационарах России. Клин микробиол антимикроб химиотер. 2009. Т.11(2)
2. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. Porcine Health Manag. 2017.3 (16).
3. Okeke I.N., Nataro J.P. Enteroaggregative Escherichia coli. Lancet Infect Dis. 2001. 1(5):304-13.
4. Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998. 11(1):142-201.
5. Salmani H., Azarnezhad A., Fayazi M.R., Hosseini A. Pathotypic and Phylogenetic Study of Diarrheagenic Escherichia coli and Uropathogenic E. coli Using Multiplex Polymerase Chain Reaction // Jundishapur J Microbiol. 2016. 9(2):e28331.
6. Miri S.T., Dashti A., Mostaan S., Kazemi F., Bouzari S. Identification of different Escherichia coli pathotypes in north and north-west provinces of Iran // Iran J Microbiol. 2017, 9(1):33-37.
7. Van T.T., Chin J., Chapman T., Tran L.T., Coloe P.J. // Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes // Int J Food Microbiol. 2008. 124(3):217-23.
8. Зубрицкий А.В., Ильина Е.Н., Стрельченко С.А, Малахова М.В., Ленев С.В., Скляров О.Д., Панин А.Н., Говорун В.М. Изучение молекулярных механизмов резистентности к аминогликозидным антибиотикам возбудителей сальмонеллеза. Антибиотики и хемиотерапия. 2011, 56, С. 9-11.
DOI: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.

УДК 619.614.48

РОЛЬ ДЕЗИНФЕКЦИИ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ

Попов Н. И., д-р вет. наук, профессор, заведующий лабораторией дезинфекции, зам. руководителя ВНИИВСГЭ;

Суворов А. В., канд. вет. наук, зам. руководителя ВНИИВСГЭ;

Мичко С. А., канд. вет. наук, старший научный сотрудник;

Лобанов С. М., канд. вет. наук, старший научный сотрудник.

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. E-mail: vniivshe@mail.ru Москва 123022, Российская Федерация, 8(499)256-35-81

В статье представлена роль и значимость дезинфекции в санитарных мероприятиях на объектах ветеринарного надзора. Основные направления развития современной дезинфекции в связи с осложнением эпизоотической ситуации в стране.

Ключевые слова: дезинфекция, объекты ветеринарного надзора, способы дезинфекции.

В системе ветеринарно-санитарных мероприятий, обеспечивающих благополучие животноводства по заразным болезням, повышение продуктивности животных и санитарного качества продуктов, сырья и кормов животного происхождения, дезинфекция занимает одно из важных мест.

Под дезинфекцией понимают уничтожение на объектах внешней среды или удаление из них патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Основное назначение дезинфекции – разорвать эпизоотическую цепь путем воздействия на ее важнейшее звено, фактор передачи возбудителя болезни от источника инфекции к восприимчивому организму.

Эффективность дезинфекции как меры профилактики и лик-

видации инфекционных болезней во многом зависит от комплексности ее проведения. Даже полная стерилизация помещений для животных, если она и может быть достигнута, окажется напрасной тратой времени и средств, если остальные объекты (одежда и обувь обслуживающего персонала, уборочный инвентарь, внутрифермский транспорт, а самое главное, само животное, т.е. его кожно-волосяной покров, на котором длительное время могут сохраняться патогенные микроорганизмы) останутся необеззараженными, т.е. когда не устранены все пути и факторы распространения инфекционного начала.

На предприятиях ветеринарного надзора дезинфекцию необходимо включать в план противоэпизоотических мероприятий по каждой ферме и хозяйству в целом. В плане должны быть предусмотрены сроки проведения, методы и режимы дезинфекции производственных и вспомогательных помещений, транспортных средств, спецодежды, обуви и других объектов, потребность в дезинфицирующих средствах, моечно-дезинфекционной технике, кадрах с учетом объема работ, расположения объектов, технологии производства, эпизоотической ситуации и других особенностей хозяйств. Также должен быть предусмотрен резерв дезинфицирующих средств в количестве не менее 10-15% от годовой потребности.

Для дезинфекции применяют средства, разрешенные к применению и зарегистрированные в Российской Федерации в установленном порядке, имеющие сертификаты завода-изготовителя, удостоверяющие их соответствие требованиям Государственных стандартов или технических условий и наставления по применению.

Объектами ветеринарной дезинфекции являются:

1. территории ферм, все находящиеся на ней животноводческие, складские, бытовые и прочие сооружения с имеющимися в них местами постоянного или временного пребывания животных, а также ветеринарные клиники, лечебницы, виварии, питомники и т.п.;

2. предприятия по убою животных, сбору, хранению или переработке продукции и сырья животного происхождения;

3. транспортные средства, используемые для перевозки животных, кормов, продуктов и сырья животного происхождения;

4. инвентарь и предметы ухода за животными, одежда и обувь обслуживающего животных персонала и работников предприятий перерабатывающей промышленности;

5. навоз, помет, сточные воды животноводческих ферм и предприятий перерабатывающей промышленности;

6. скотомогильники, другие места захоронения, падежа или вынужденного убоя животных;

7. корма, подстилка, вода для поения животных, другие материалы, с которыми прямо или косвенно могут контактировать животные или обслуживающий персонал и которые могут быть фактором передачи возбудителей инфекционных болезней от больных животных или бактерионосителейк здоровым.

Профилактическую дезинфекцию проводят в благополучных по инфекционным болезням животных и птицы хозяйствах с целью предотвращения заноса возбудителей инфекционных болезней, а также накопления условно-патогенной микрофлоры.

Вынужденную дезинфекцию (текущую и заключительную) проводят в хозяйствах неблагополучных по инфекционным болезням животных и птицы, с целью локализации первичного очага инфекции, предотвращения распространения болезни внутри хозяйства и за его пределами.

Текущая дезинфекция. Текущую дезинфекцию проводят периодически в течение всего времени оздоровления хозяйства (фермы) с целью снижения уровня контаминации объектов внешней средыпатогенными микроорганизмами и уменьшения опасности пе-

резаражения животных внутри хозяйства (фермы) и предотвращения распространения болезни.

Периодичность проведения текущей дезинфекции и перечень объектов дезинфекции устанавливают с учетом характера болезни, эпизоотической ситуации по данной болезни, специфики технологии производства, природно-климатических условий и других особенностей неблагополучного пункта или зоны его расположения, а также требований действующей инструкции по борьбе с той или иной болезнью.

После выявления и изоляции больных или подозреваемых по заболеванию животных все помещения, в которых они находились, внутреннее оборудование и инвентарь, выделения, навоз и остатки корма, которые могут быть контаминированы возбудителем болезни, другие объекты, предметы и материалы, с которыми контактировали больные или подозреваемые по заболеванию животные, сразу же необходимо увлажнить дезинфицирующим раствором, рекомендованным при данной болезни, с последующей механической очисткой и дезинфекцией.

В помещениях для содержания животных, больных и подозрительных по заболеванию особо опасными болезнями, не реже двух раз в день проводят влажную уборку станков, кормушек, поилок и один раз в день (после утренней уборки) – дезинфекцию проходов, коридоров, тамбуров. Подстилку, навоз и остатки корма, собранные при уборке этих помещений, отправляют на утилизацию в порядке, предусмотренном инструкцией по борьбе с данной болезнью.

При наличии послеродовых заболеваний очистку и дезинфекцию загрязненных выделениями животных участков помещений проводят не реже 2-3 раз в день. При этом место, загрязненное выделениями животных, посыпают опилками или торфом, смешанными (1:10) с известью-пушонкой или хлорной известью, собирают загряз-

нения в водонепроницаемую тару и отправляют на уничтожение. Загрязненные места орошают дезраствором.

В каждом изолированном помещении или секции устанавливают емкости с дезраствором для обеззараживания уборочного инвентаря и предметов ухода за животными, металлические бочки с крышками для сбора последов, мертворожденных плодов и трупов поросят, а также влагонепроницаемую тару для сбора и отправки на обеззараживание спецодежды, полотенец, мешкотары и т. п.

В каждом помещении, где содержатся животные, больные или подозрительные по заболеванию опасными инфекционными болезнями, постоянно должны быть запасные комплекты спецодежды для обслуживающего персонала и ветеринарных специалистов.

При значительном распространении болезни внутри хозяйства проводят ежедневную очистку или влажную уборку помещений и другие мероприятия, направленные на предупреждение накопления возбудителя на объектах внешней среды и его рассеивания за пределы очага инфекционной болезни, а помещения дезинфицируют по мере их освобождения от животных в технологические разрывы или после ликвидации болезни.

Заключительная дезинфекция. Заключительную дезинфекцию проводят в оздоровленном хозяйстве (ферме) непосредственно перед снятием карантина (ограничения) после прекращения выделения больных животных и выполнения мероприятий, гарантирующих ликвидацию источника возбудителя болезни.

Целью заключительной дезинфекции является полное уничтожение возбудителей инфекционных болезней на всех объектах внешней среды, которые могут быть фактором передачи. Перед заключительной дезинфекцией истребляют грызунов и насекомых, обитающих в животноводческих помещениях, на территории ферм, навозохранилищах, освобождают животноводческие помещения и

территории ферм от диких птиц, бродячих собак и кошек.

Территория ферм и выгульные площадки перед проведением заключительной дезинфекции должны быть очищены от навоза, навозной жижи, травянистой растительности и кустарников, посторонних материалов. Собранные при этом сухой навоз, мусор, другие сгораемые материалы сжигают на месте. Несгораемые материалы, после их предварительного увлажнения дезинфицирующим раствором, вывозят с соблюдением мер предосторожности на площадки для обеззараживания или закапывания в специально отведенных местах.

При бактериальных и вирусных инфекциях пригодные для повторного использования строительные материалы обеззараживают методом погружения в дезинфицирующий раствор на 24-48 ч с последующей очисткой и высушиванием на солнце или методом длительного выдерживания в течение времени, превышающего сроки выживания возбудителя болезни во внешней среде.

Для заключительной дезинфекции при споровых инфекциях и инфекционных болезнях невыясненной этиологии дезинфицирующий раствор наносят однократно, при особо опасных болезнях бактериальной, вирусной и иной этиологии – двукратно с интервалом 1 ч, считая с момента окончания предшествующей обработки. Экспозиция после последнего нанесения дезраствора 12-24 ч. При остальных обработку проводят однократно. Экспозиция не менее 6 ч.

Концентрацию растворов дезинфицирующих средств определяют исходя из целей дезинфекции и принадлежности возбудителя к той или иной группе устойчивости.

Обеззараживание навоза и помета. Подстилка, выделения и навоз от животных, больных и подозрительных по заболеванию сибирской язвой, классической чумой свиней и африканской чумой свиней, подлежат сжиганию.

Жидкий (до разделения на фракции), полужидкий навоз и на-

возные стоки при инфекционных болезнях бактериальной этиологии обеззараживают жидким аммиаком (30 л/м) с последующим укрытием хранилища полиэтиленовой пленкой или нанесением на поверхность навоза пленки масляного альдегида слоем 1-2 мм. Экспозиция обеззараживания 5 сут.

При бактериальных инфекциях (кроме туберкулеза) жидкий навоз и стоки также можно обеззараживать формалином (7,5 л/м^3) с последующим перемешиванием в течение 6 ч и выдержкой 72 ч или термическим способом с помощью мобильной установки для термического обеззараживания навоза при температуре 130°С, давлении 0,2 МПа и экспозиции 10 мин.

Дезинфекция аэрозолями. Профилактическую, текущую и заключительную дезинфекцию закрытых помещений также проводят аэрозолями. Для этого используют 37%-ный раствор формальдегида (формалин), глутаровый альдегид с содержанием 25% действующего вещества.

Перед проведением аэрозольной дезинфекции помещения герметизируют: закрывают двери, окна, люки естественной ипринудительной вентиляции, выходные люки каналов навозоудаления, заклеивают бумагой или заделывают подручными материалами сквозные щели. Температура воздуха в помещении должна быть не ниже 12°С, а относительная влажность воздуха не менее 60%. При меньшей относительной влажности необходимо предварительно, распылить в помещении воду (10 мл/м).

Дезинфекция бактерицидными пенами. Бактерицидные пены представляют собой препаративную форму дезинфектантов, получаемую с помощью пеногенератора из рабочего раствора дезинфицирующего средства, в котором содержится биологически мягкое поверхностно–активное вещество-пенообразователь. Данный способ дезинфекции объектов ветеринарного надзора разработан в

ВНИИВСГЭ, отвечает требованиям не только современной науки, но и ветеринарной практики.

По сравнению с существующим способом влажной дезинфекции применение бактерицидных пен обеспечивает более продолжительный контакт дезинфицирующего средства с обрабатываемыми поверхностями, особенно с имеющими сложную конструкцию (рифленые, сетчатые, решетчатые) а также с потолочными и вертикальными.

При данном способе дезинфекции повышается производительность труда в 1,5-2 раза, сокращается расход препаратов в 2-3 раза в сравнении с влажным способом дезинфекции и при этом повышается эффективность проводимых обработок.

Контроль качества дезинфекции проводится в 3 этапа:

1. Контроль подготовки объекта к дезинфекции. При этом проверяют степень очистки поверхностей, их увлажненность, защиту электрооборудования и приборов, герметизацию помещений. Особое внимание обращают на состояние деревянных полов, наличие воды в кормушках, поилках, очистку территории. Необходимо иметь в виду, что при наличии органических загрязнений (навоз, помет, остатки корма и т.п.) не будет достигнут желаемый результат при дезинфекции. Во всех инструкциях и наставлениях режимы дезинфекции даны в расчете на обработку тщательно очищенных поверхностей.

2. Выбор препаратов и контроль за соблюдением установленных режимов дезинфекции. При этом необходимо иметь в виду, что катионные – ПАВ избирательно активны в отношении кокковой микрофлоры и вирусов с липидной оболочкой, мене активны в отношении грамнегативных микроорганизмов, не действуют на безоболочечные вирусы, микобактерии и споровые формы.

Для обеззараживания зажиренных поверхностей, там, где есть необходимость одновременной мойки и дезинфекции (объекты мя-

соперерабатывающей промышленности и др. аналогичные объекты), наиболее приемлемыми могут оказаться бактерицидные пены. Бактерицидные пены можно с успехом применять при обработке различных воздуховодов, трубопроводов, навозных каналов путем их объемного заполнения пеной, они хорошо зарекомендовали себя при обработке сетчатых клеток для содержания пушных зверей и птицы.

Особое внимание следует обращать на соблюдение концентрации рабочих растворов (с учетом содержания действующего вещества в имеющихся препаратах), температуры и нормы расходования растворов, равномерность увлажнения поверхностей, соблюдения параметров производительности используемых машин и аппаратов.

Бактериологический контроль. По устойчивости к дезсредствам, а также с учетом степени опасности болезни и защищенности микроорганизмов биологическими субстратами, возбудителей основных инфекционных болезней животных и птицы делят на 4 группы:1-я группа устойчивости - **малоустойчивые**; 2-я группа устойчивости - **устойчивые**; 3-я группа устойчивости – **высокоустойчивые**; 4-я группа устойчивости - **особо устойчивые**.

При этом определяют наличие или отсутствие в смывах или соскобах с поверхности, пробах почвы санитарно-показательных микроорганизмов.

При контроле эффективности профилактической и вынужденной дезинфекции при бактериальных (исключая туберкулез) и некоторых вирусных инфекциях, возбудители которых отнесены к **1-й группе устойчивости**, качество дезинфекции контролируют по выделению бактерий группы кишечной палочки. При большинстве вирусных и кокковых инфекций – **2-я группа устойчивости** – по выделению стафилококков. При туберкулезе – по выделению стафилококков (текущая дезинфекция) и микобактерий (заключительная) –

3-я группа. При споровых инфекциях – по выделению спорообразующих аэробов рода Bacillus – **4-я группа**.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение о том, что только соблюдение всех указанных этапов, предшествующих дезинфекции, проведение самой дезинфекции с осуществлением ее контроля качества не окажутся напрасной тратой средств и времени, а будут эффективной мерой профилактики и ликвидации инфекционных болезней животных.

Литература

1. Поляков А. А, «Ветеринарная дезинфекция». – М., 1964. – С. 3–475.
2. Методические указания «О порядке испытания новых дезинфицирующих средств в ветеринарной практике». – М., 1987.
3.Селиверстов В. В., Дудницкий И. А., Попов Н. И. «Дезинфекция в системе ветеринарно-санитарных мероприятий». // «Ветеринария». – 1999. – № 2. – С. 3.
4. Правила проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора. – М., 2002. – С. 4–104.
5. Попов Н. И., Ивановцев В. В. Волковский Г. Д. и др. «Ветеринарная дезинфекция на службе страны»// Ветеринария. – 2005. – № 10. – С. 11–14.
6. Попов Н. И. «Дезинфекция при инфекционной патологии свиней». Всероссийский ветеринарный конгресс. XV Московский международный конгресс. Проблемы инфекционной патологии свиней. М., 21–23 апреля, 2007, С. 45.
7. Смирнов А. М. «Роль ветеринарно-санитарной науки в обеспечении благополучия животноводства» // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2009. – № 1. – С. 7.
8.Дорожкин В.И., Смирнов А.М., Гуненкова Н.К.,Суворов А.В., Попов Н.И.. «Роль ветеринарно-санитарной науки в обеспечении здоровья животных, биологической безопасности животноводческой продукции и охраны окружающей среды. // «Ветеринария и кормление», 2017 - № 2. – С. 14-16.

УДК 619:616.995.7:615.7

ПРОГРАММА ДЛЯ СИСТЕМНОГО УНИЧТОЖЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ МУХ В УСЛОВИЯХ ПТИЦЕФАБРИКИ ПРИ КЛЕТОЧНО-БАТАРЕЙНОМ СОДЕРЖАНИИ ПТИЦЫ

Сафиуллин Р.Т., д.в.н., профессор, зав. лабораторией санитарной паразитологии,safiullin@vniigis.ru

Новиков П.В., к.в.н., научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Москва, Б. Черемушкинская, 28, 117218

Нуртдинова Т.А., ветеринарный врач, менеджер по ключевым клиентам птицеводства АО «Байер», г. Москва

Дементьева В.А., главный ветеринарный врач

ПФ «Центральная», Владимирская область

Аннотация. Оценка фонового количества насекомых в конце предыдущего технологического цикла выращивания бройлеров показала, что в птичниках присутствовало большое количество имаго мух (1040 экз. на один мухолов) и их личинок (145 экз. в одной пробе). Научно-производственное испытание показало, что комплексная инсектицидная программа «Квик БайтВГ 10%» + «Байцидал® ВП 25%» позволила уничтожить имаго мух (ИЭ — 98,3%) и их личинок (ИЭ — 99,8%) при высокой интенсивности инвазии при клеточной технологии выращивания птицы.

Ключевые слова: клеточное содержание птицы, зоофильные мухи, личинки мух, комплексная инсектицидная программа, адалти-

цид «Квик Байт ВГ 10%», ларвицид «Байцидал® ВП 25%», интенсэффективность.

Program for the systematic destruction of the population of flies in the conditions of a poultry farm with cell-battery poultry keeping

Safiullin R.T., Novikov P.V.
All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants - branch of FSBSI FSC ARSRIEV named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko RAS (ARSRIFAP - branch of FSBSI FSC ARSRIEV RAS)
Nurtdinova T.A., Bayer JSC
Dementieva V.A., PF Centralnaya, Vladimir region

Abstract. An estimate of the background number of insects at the end of the previous broiler production cycle showed that there were a large number of imago flies in the poultry houses (1040 specimens per muholov) and their larvae (145 specimens in one sample). Scientific production test show that complex insecticide program “QuickBayt VG 10%” + “Bycidal® VP 25%” allows to eradicate adult flies (IE - 98.3%) and their larvae (IE - 99.8%) with a high intensity of invasion in the cell technology of growing birds.

Key Words: cage poultry raising, zoophilic flies, fly larvae, complex insecticide program, adulticide “Quick Bayt VG 10%”, larvicide “Bycidal VP 25%” intense efficiency.

Важным фактором в развитии отечественного птицеводства является выращивание птицы в помещениях, свободных от эндо- и эктопаразитов. На птицефабриках промышленного типа, особенно на клеточном оборудовании, при неполном соблюдении технологии выращивания и ветеринарно-санитарных правил создаются благоприятные условия для развития, размножения и накопления в птичниках большого количества зоофильных мух. Проведенными

исследованиями установлено, что мухи являются переносчиками инфекционных и инвазионных болезней человека, животных и птиц.

Экономический ущерб от мух складывается из снижения яйценоскости кур, уменьшения прироста живой массы у цыплят, преждевременной выбраковки больных птиц, а также из ущерба имиджу компании при обнаружении личинок мух в мясе птицы и полуфабрикатах.

Для правильной организации успешной борьбы с мухами следует всегда помнить, что популяция мух состоит только на 15% из взрослых особей, а на 85% — из личинок на разных стадиях развития. Поэтому успешное решение проблемы с мухами в птицеводстве требует одновременного применения средств как против взрослых особей, так и против личинок.

Исходя из отмеченного, было проведено испытание по оценке эффективности комплексной инсектицидной программы для системного уничтожения популяции мух с применением адалтицидного препарата «КВИК Байт ВГ 10%» против имаго мух и ларвицидного препарата «Байцидал ВП 25%» для личиночных стадий в условиях птицефабрики при клеточно-батарейном содержании цыплят-бройлеров.

Производственное испытание проводили с июля по сентябрь 2017 г. на базе птицефабрики «Центральная» Владимирской области, лабораторные исследования — на базе ВНИИП имени К.И. Скрябина (г. Москва). Исследования были проведены в трех аналогичных птичниках: двух опытных и одном контрольном, с общим поголовьем при посадке 99 тыс. гол. Все птичники однотипные, с ленточным пометоудалением, оборудованы трехъярусными батарейными клетками, установленными в шесть рядов, под которыми по всей длине птичника проходят пометные каналы. В хозяйстве применялась базо-

вая инсектицидная программа против мух с использованием адалтицидного препарата на основе фипронила.

Численность имаго мух в птичниках оценивали в динамике, используя мухоловы (липкая лента «Мухолов-Капкан»), 6 ловушек в каждом птичнике, размещенных на разном уровне от пола. Через 24 ч ловушки снимали и проводили подсчет количества прилипших насекомых.

Численность личинок оценивали в динамике по результатам исследования проб с пола площадью 10х10 см, массой 3-5 г, и содержимого навозных каналов под батарейными клетками с использованием специального пробоотборника по шесть проб из каждого птичника. Отбор проб проводили первый раз в конце выращивания предыдущей партии птицы, затем через 24 ч после проведенной обработки, затем еженедельно в течение всего срока выращивания бройлеров.

Полученные в ходе испытаний экспериментальные данные по количеству имаго мух и их личинок были подвергнуты статистическому анализу по методике Н.А Плохинского (1978) с определением их значимости.

Оценка фонового количества насекомых в конце предыдущего технологического цикла выращивания бройлеров показала, что в птичниках присутствовало очень большое количество имаго мух (1040 экз. на один мухолов) и их личинок (145 экз. в одной пробе), несмотря на использование рекомендованной дозы инсектицидного препарата на основе фипронила. Это указывало на высокую угрозу для хозяйства.

После окончания технологического цикла производства и проведения санитарной подготовки корпусов согласно принятой технологии, перед заселением новой партии птицы, провели инсектицидные обработки птичников.

В опытных птичниках против взрослых особей мух применили адалтицидное средство «КВИК Байт ВГ 10%». Расчет препарата производили по площади пола. Расход на 1 м² пола — 2,5 г препарата «КВИК Байт ВГ 10%», который разводили в 20 мл воды. Наносили рабочий раствор на вертикальные поверхности опрыскиванием, с помощью спреера «Глория», с рабочим давлением не более 1 бар. Обработали методом вертикального зигзага суммарно около 30% площади стен и других вертикальных поверхностей, где предпочитают находиться мухи (теплые солнечные стены, вентиляционные отверстия, оконные рамы, плафоны светильников и т.п.) на высоту до 2,5 м.

Для уничтожения личинок мух была проведена обработка пола ларвицидным препаратом «Байцидал ВП 25%», сразу после обработки стен препаратом «КВИК Байт ВГ 10%». Расход препарата «Байцидал ВП 25%» составил 2 г на 1 м² обрабатываемой поверхности пола. Рабочий раствор наносили с помощью крупнокапельного спрея, используя ДУК, из расчета 200-300 мл на 1 м² пола, пометных каналов, пометных ям, транспортеров и других мест, где могут накапливаться остатки корма, помета, служащие местом расплода мух.

В контрольном птичнике была проведена плановая дезинсекция против мух с использованием рекомендованной дозы базового препарата на основе фипронил.

Среднее количество взрослых мух в опытных птичниках после обработки препаратом «КВИК Байт ВГ 10%» резко снизилось по сравнению с фоновым и составило 18 экз. на один мухолов. «КВИК Байт ВГ 10%», действующим веществом которого является имидаклоприд (группа никотиноидов), обладает выраженным контактным и кишечным инсектицидным действием против окрыленных мух. В то же время в контрольном птичнике после плановой дезинсекции препаратом на основе фипронила количество имаго мух составило 1015 экз.

После обработки препаратом «Байцидал ВП 25%» в опытных птичниках все пробы, взятые из содержимого пола и пометных каналов, были свободны от личинок мух. «Байцидал ВП 25%» обладает ларвицидным действием, нарушает процесс развития личинки, которая погибает до превращения во взрослую особь. Действующее вещество — трифлумурон — блокирует образование хитина, который необходим для ростовых процессов в ходе линек личинок при переходе из одной стадии в другую. Также трифлумурон обладает овоцидным действием, приводящим к гибели эмбрионов и вылупившихся из яиц личинок. Отмечено стерилизующее действие на взрослые особи. После обработки препаратом «Байцидал ВП 25%» взрослые половозрелые самки не дают жизнеспособного потомства. Данные еженедельных исследований, полученные в ходе дальнейшего проведения опыта, дали возможность оценить продолжительность инсектицидного действия использованных препаратов.

Количество мух и личинок в опытных птичниках после обработки препаратами «КВИК Байт ВГ 10%» + «Байцидал ВП 25%» оставалось очень низким, практически близким к нулю, на протяжении всего периода выращивания бройлеров (38 сут.). Пролонгированное действие адалтицида «КВИК Байт ВГ 10%» уничтожало взрослых мух, а ларвицида «Байцидал ВП 25%» — не позволяло развиваться личинкам в течение всего производственного цикла, что привело к значительному снижению популяции мух в птичниках.

В контрольном птичнике, где не использовали ларвицид, а применяли только адалтицид на основе фипронила, личинки отмечались в больших количествах в пометных траншеях под клеточными батареями и на полу, куда попадал птичий корм и помет. Соответственно численность мух в этих местах была очень высокая и незначительно снизилась к концу тура с понижением температуры воздуха.

Результаты проведенных исследований показали, что комплексная инсектицидная программа «КВИК Байт ВГ 10%» + «Байцидал ВП 25%» обеспечила высокую интенсэффективность, как против имаго мух (ИЭ 98,3%), так и против их личинок (ИЭ 99,8%) за весь период выращивания бройлеров в сложных производственных условиях при высокой интенсивности инвазии при клеточной технологии. Для сравнения, интенсэффективность препарата на основе фипронила в контрольном птичнике против имаго мух составила 3,26%, против личинок мух — 52,1%.

Высокие результаты от применения комплексной программы были получены благодаря длительному действию препарата «Байцидал ВП 25%», который на протяжении всего технологического цикла не позволил личинкам мух трансформироваться во взрослые особи, тем самым значительно снизил популяцию мух. Это свидетельствует о том, что сильной стороной данной комплексной инсектицидной программы является ларвицид «Байцидал® ВП».

Литература

1. Веселкин Г.А. Зоофильные мухи и меры борьбы с ними. Ветеринария. 1981; 7:24 – 27., 2. Кербабаев Э.Б., Василевич Ф.И., Катаева Т.С. Арахноэнтомозы сельскохозяйственных животных. М., 2000; 137 с.,
3. Покровский С.Н., Зима Г.Г. Мухи как переносчики глист в естественных условиях. Мед.паразитол. М., 1939; 7:262 – 264., 4. Правила проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора. М., 2002; 74 с., 5. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии. М., 1978; 264 с., 6. Сафиуллин Р.Т. Эффективность себацила при паразитарных болезнях животных. Ветеринария. 1995; 5:37 – 39.,
7. Сафиуллин Р.Т., Новиков П.В. и др. Дракер 10.2 – новый инсектицид пролонгированного действия. Ветеринария. 2011; 5:11 – 15.

УДК573.088.1

ЦИФРОВЫЕ РЕЖИМЫ ФОРМИРОВАНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ *INVITRO*

Сидорова В.Ю., д.с.-.х.н., ведущий специалист

Институт механизации животноводства – филиал ФГБНУ ФНАЦ ВИМ

108823 Москва, пос. Рязановское, поселок Знамя Октября, д. 31, Россия gdi20071@yandex.ru,8-916-86-38-378

Аннотация. Питательные среды являются одним из основных элементов культивирования мезенхимных мультипонентных стволовых клеток ММСК животных в искусственных условиях *in vitro* в биореакторах. Стволовая клетка чувствительна к внешней и внутриклеточной концентрации ионов таких металлов, как Na+, K+ (катионы) и Cl^- , бикарбонат HCO_3^- (анионы). Диффузия этих элементов через клеточную мембрану способствует изменению электрического заряда клетки с «+» на «-», вследствие действия калий-натриевого мембранного насоса. В зависимости от его действия и в связи с этим, клетка, традиционно обладающая слабым отрицательным зарядом - 1,5-1,8 МЭКВ/г, изменяет электрический заряд на противоположный, плохо прикрепляется к положительно заряженному субстрату и перестает делиться, вне зависимости от соблюдения других параметров культивирования культурального устройства. Среда ДМЕМ содержит: солей 10066 мг/л, аминокислот 1100 мг, витаминов 33,6 мг, сыворотки 120 мл., что на единицу pH составит: 0,01; 0,007; 0,2; 0,06; 1: столько компонентов необходимо дополнительно добавлять в среду с

учетом увеличения биомассы СК, продуктов дыхания и метаболитов, во избежание закисления. Цифровое выражение модели баланса среды с учетом ее буферности:0,89НС+0,097АК+0,003ВТ+ 0,011СКЖ = 1, где НС- неорганические соли, АК-аминокислоты, ВТ-витамины, СКЖ- сыворотка; с учетом неучтенных факторов: 12,4 НС + 1,4 АК+0,004 ВТ+0,14СКЖ + 86,1НФ = 100**,** где НФ – неучтенные факторы.

Ключевые слова: питательная среда, стволовая клетка, цифровые режимы культивирования, закисление среды, метаболиты, цифровая модель баланса питательной среды.

THE DIGITAL REGIMES OF MEDIUM NUTRIENT COMPOSITION FORMATION FOR ANIMALS STEM CELLS CULTIVATION *IN VITRO*

Sidorova V.Y., Institute of livestock mechanization the filial of FGBNY FNAC VIM 108823, Moscow, 31, Ryazanovskoe settl., Znamya Oktyabrya village, Russia, gdi20071@yandex.ru ,
8-916-86-38-378

Resume. Medium is one of the main elements of the MMSK animals mesenchymal multi-component stem cells cultivation in artificial conditions *in vitro* in bioreactors. At stem cells' biomass growing in reactors, nutrient media, thanks to its mineral elements' composition, performs several functions: nutrition and respiration of SC promoting, and ultimately, the optimal biomass growing , the of the solution at the 7,0-7,2 pH required necessary level and required amount of electrical membrane potential maintaining, good adhesion to the substrate contributing. The stem cell is sensitive to external- and intracellular concentration of ions of such metals as Na+, K+ (cations) and Cl -, bicarbonate HCO3- (anions). Diffusion of these elements through the cell's membrane helps to change the electric charge of the cell from " + "to" -", due to the of potassium-sodium membrane pump's action. Depending on his actions in this regard, the cell

traditionally has a weak negative charge from 1,5 to 1.8 MEQ/g, the electrical charge on the opposite, the bad attaches to the positively charged substrate and ceases sharing, regardless of compliance with other parameters of cultivation in cultural device.

Medium DMEM contains : salt 10066 mg/l, amino acids 1100 mg, vitamins 33,6 mg, serum 120 ml, that per pH unit will be: 0,01; 0,007; 0,2; 0,06; 1. As many as components it should be added to the given medium due to SC biomass, products of respiration and metabolites increasing, in order to avoid acidification. Digital expression of the medium balance model, taking into account pH: 0,89 NS + 0,097 AK+0,003 V+ 0,011 = 1, where NS - inorganic salts, AK-amino acids, V-vitamins, SKJ - serum; taking into account non- considered factors: 12,4 NS + 1,4 AK+0,004 V+0,14 SKJ + 86,1 NF = 100, where NF – unaccounted factors.

Key words: nutrient medium, stem cell, cultivation regimes' digital model, medium acidification, metabolites, the nutrient medium balance's digital model.

Введение. Методы клеточной биологии находят все большее распространение в различных областях современных фундаментальных и прикладных исследований в том числе в ветеринарии. Одним из наиболее используемых среди них является метод искусственного культивирования стволовых клеток (СК). В настоящее время можно культивировать СК практически всех тканей и органов человека, животных и растений. Культивирование клеток становится основой современных наукоемких технологий в ветеринарии, биотехнологии, фармакологии, медицине, клеточной инженерии и т.д.

Питательные среды являются одним из основных элементов культивирования мезенхимных мультипонентных стволовых клеток ММСК животных в искусственной среде *in vitro* в биореакторах. При выращивании биомассы стволовых клеток в реакторах, питательные среды, благодаря своему составу минеральных элементов, выполня-

ют несколько функций: способствуют питанию и дыханию СК, и в конечном счете, оптимальному росту биомассы, поддержанию необходимой буферности раствора на требуемом уровне 7,0-7,2 pH, поддерживают необходимую величину электрического мембранного потенциала стволовой клетки, способствующему хорошей адгезии к субстрату [1,2].

Стволовая клетка чувствительна к внешней и внутриклеточной концентрации ионов таких металлов, как Na+, K+ (катионы) и Cl^-, бикарбонат HCO_3^-(анионы) [3]. Диффузия этих элементов через клеточную мембрану способствует изменению электрического заряда клетки с «+» на «-», вследствие действия калий-натриевого мембранного насоса. В зависимости от его действия ив связи с этим, клетка, традиционно обладающая слабым отрицательным зарядом - 1,5-1,8 МЭКВ/г, изменяет электрический заряд на противоположный, плохо прикрепляется к положительно заряженному субстрату и перестает делиться, вне зависимости от соблюдения других параметров культивирования в искусственной среде *in vitro* культурального устройства.

Материал и методы исследования. Подготовка рабочих питательных сред осуществлялась в камере перемешивания двухкамерного биореактора для культивирования стволовых клеток по технологии *in vitro*. Требования, предъявляемые к питательным средам определяли в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [4]. При указании концентрации растворов в процентах, следует подразумевать весообъемные проценты. Например, для приготовления 10%-го раствора следует брать 10 г вещества на 100 мл готового раствора [5].

Обсуждение полученных результатов. Постоянство pH среды является одним из главных условий культивирования. Контроль pH можно осуществлять визуально: норма pH - цвет среды томатно-красный, в случае закисления – жёлтый, защелачивания – фиолето-

вый. Для приготовления питательных сред, кроме бидистиллированной воды, обычно используют солевые растворы Эрла и Хенкса, или фосфатносолевой буфер Дульбекко и Фогта. Осмотическое давление определяется числом молей осмотически активных частиц ионов и неионизированных молекул, растворенных веществ на 1 кг растворителя (явление осмоляльности) или на 1 литр раствора (явление осмолярности). В разбавленных водных растворах эти величины близки.

Диапазоны pH и осмоляльности, при которых происходит размножение стволовых клеток в искусственных средах, узки и варьируют в зависимости от условий культивирования. Для стволовых клеток ММСК КРС pH равно 7,0 – 7,2 ± 0,15, осмоляльность 280 мосм (миллиосмолей) /кг, плотность 1,072 г/мл, вязкость $0{,}158*10^{6}$ м2/сек. Для поддержания pH в большинстве сред используется бикарбонатный буфер: HCO3 = CO2 + OH. Так, в стандартной среде ДМЕМ: неорганических солей 10066 мг/л, аминокислот 1100 мг/л, витаминов 33,6 мг/л, феноловый красный 8,1 мг/л, сыворотка крови животных 120-100 мл/л. Для культивирования не требуется свет. На Рис.1 показаны компоненты питательной среды ДМЕМ, которые выражаются в мг /мл.

Если приравнять их к*1* единице pH раствора, то получим значения: 0,01; 0,007; 0,2; 0,06; 1, или к *0,1* доле единицы pH раствора; 0,001; 0,0007; 0,02; 0,006; 0,1, или к *0,01* доле единицы pH раствора0,0001; 0,00007; 0,002; 0,0006; 0,01. Такое количество компонентов необходимо дополнительно добавлять в раствор с учетом увеличения количества биомассы СК и повышения выделения их метаболитов, продуктов дыхания и жизнедеятельности, во избежание закисления среды культивирования. Таким образом, с увеличением количества биомассы клеток время периода между заменой истощенной питательной жидкости уменьшается, а весовое количество компонентов питательной смеси (мг, мл) пропорционально увеличивается: неорга-

нических солей 10066 + аминокислот 1100+ витаминов 33,6+ сыворотка крови животных 120, соответственно равно 1:0,11:0,003:0,1, на каждую единицу неорганических солей, как основного компонента культивирования.

Замена истощенной жидкости может осуществляться в рамках двух однозначных технологий: увеличением *количества* компонентов в одной пищевой дозе, даваемой за равные по продолжительности периоды замены истощенной питательной жидкости; увеличением *кратности* замены истощенной питательной жидкости с учетом увеличения биомассы СК, при неизменном количестве питательных элементов. Первый технологический прием менее желателен, так как клетки чувствительны к повышению вязкости среды. Следовательно, с учетом условий культивирования: температуры, pH, избыточного давления, и т.д., можно в цифровой форме рассчитать время периодов между заменой истощенной питательной жидкости с учетом увеличения биомассы за любой период культивирования.

Цифровое выражение оптимального культивирования с учетом буферности среды равняется:0,89НС+ 0,097АК+ 0,003ВТ + 0,011СКЖ= 1, где НС- неорганические соли, АК-аминокислоты, ВТ-витамины, СКЖ- сыворотка крови (Рис.1),

или, с учетом неучтенных факторов влияния процентное цифровое выражение оптимальной модели баланса питательной жидкости равняется:

$$12{,}4\ НС + 1{,}4\ АК + 0{,}004\ ВТ + 0{,}14\ СКЖ + 86{,}1\ НФ = 100,$$

где НФ – неучтенные факторы (Рис.2).

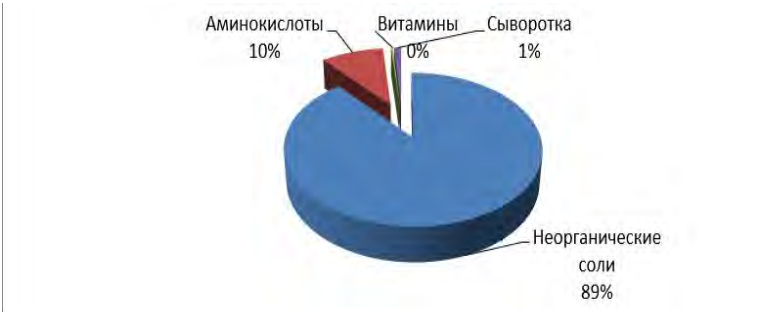


Рис.1.Цифровое выражение баланса питательной жидкости

Среди неучтенных факторов – температура культивирования, величина осмотического давления, выражение поверхностного натяжения, детализация компонентного состава питательной жидкости, осмоляльность, плотность, вязкость и т.д.

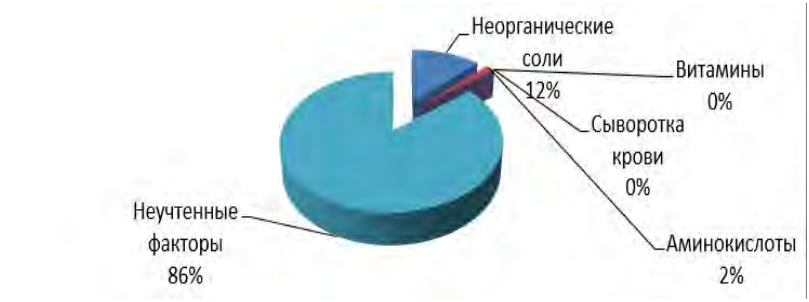


Рис.2.Модель культивирования стволовых клеток с учетом неучтенных факторов

Жидкие растворы питательных сред имеют следующие физико- химические характеристики: среда питательная 199- прозрачная жидкость красновато-оранжевого цвета без осадка, pH 7,1 - 7,5, формирование монослоя происходит на 3-4 сутки; индекс пролиферации не менее 2,0.

Выводы

1. Питательная среда имеет следующий состав: бикарбонатный фосфатно-солевой буфер – бикарбонат натрия NaHCO3, в форме по-

рошка, мг, используется для поддержание pH и осмотического давления; витамины, глюкозу, аминокислоты, углеводы, микроэлементы, в форме порошка, в мг, применяются в виде источника энергии; дистиллированную воду или физиологический раствор, в мл, применяют в виде связующей жидкости; сыворотку крови животных применяют в качестве биологической добавки к питательной среде.

2. С увеличением количества биомассы клеток время периода между заменой истощенной питательной жидкости уменьшается, а весовое количество компонентов питательной смеси (мг, мл) пропорционально увеличивается: неорганических солей (НС)10066 + аминокислот (АК) 1100+ витаминов (ВТ) 33,6+ сыворотка крови животных (СКЖ)120, соответственно 1:0,11:0,003:0,1, на каждую единицу неорганических солей, как основного компонента культивирования.

3. С учетом условий культивирования: температуры, pH, избыточного давления, и т.д., можно в цифровой форме рассчитать время периодов между заменой истощенной питательной жидкости с учетом pH и увеличением биомассы в 5 и более раз за период культивирования 36-40 суток, по сравнению с первоначальной величиной заселения $1x10^5$ стволовых клеток на 1 см2 поверхности субстрата.

4. Цифровое выражение оптимального культивирования с учетом буферности среды равняется: 0,89НС+ 0,097АК+ 0,003ВТ + 0,011СКЖ=1, где НС-неорганические соли, АК-аминокислоты, ВТ-витамины, СКЖ- сыворотка крови. С учетом неучтенных факторов влияния процентное цифровое выражение оптимальной модели баланса питательной жидкости равняется:

12,4 НС + 1,4 АК+0,004 ВТ+0,14СКЖ + 86,1НФ = 100, где НФ – неучтенные факторы.

Литература

1.Волкова И.М., Викторова Е.В., Савченкова И.П., Гулюкин М.И. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота/ // Сельскохозяйственная биология. – 2012. - № 2. – С. 32-38.

2.Иванкин, А. Н. Гидролиз нанобиомакромолекулярных систем / А. Н. Иванкин, А. А. Красноштанова. М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2010. - 396 с.

3.Савченкова, И. П. Перспективы использования стволовых клеток в ветеринарии / И. П. Савченкова, М. И. Гулюкин // Ветеринария. 2011.- № 7.-С. 3-5.

4.Сидорова В.Ю. Культивирование стволовых клеток животных ммск крс для пищевых целей по технологии «invitro» // Аграрная наука. 2016. № 7. С. 19-23.

5.Post, M. J. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects / M. J. Post //Meat Science. – 2012. – Vol. 92. – P. 297-301.

УДК 591.111.1:636.5.034

ДИНАМИКА ИНДЕКСА СООТНОШЕНИЯ ПСЕВДОЭОЗИНОФИЛОВ И ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ЦЫПЛЯТ

Моисеева А.А., младший научный сотрудник

Присный А.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник

Белгородский филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 308002, Россия, г. Белгород, ул. Курская, 4, тел.: 8(4722) 26-29-75,

e-mail: andreyprisny@gmail.com

Аннотация. Изучение морфологии и иммунобиологических свойств крови птиц является неизменно актуальным аспектом современной ветеринарной гематологии и иммунологии. Это обусловлено сложными и разнообразными функциями, которые выполняет кровь в организме. В исследованиях широко используется один из косвенных физиологических тестов – кинетика величины соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов периферической крови. При развитии состояния стресса этот показатель увеличивается за счет выброса псевдоэозинофилов из костного мозга в кровяное русло и миграции лимфоцитов в ткани. Целью исследования было изучение динамики индекса соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов в крови цыплят. У цыплят кросса «Хайсекс Браун» в течение первых двадцати суток жизни отбирали кровь путем внутрисердечной пункции. Лейкоцитарную формулу определяли путем подсчета лейкоцитов в окрашенных мазках крови. Индекс соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов (индекс Кребса) рассчитывали по

формуле. При анализе возрастных изменений индекс соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов, полученного при математической обработке лейкограммы, учитывали неоднократный перекрест графических кривых псевдоэозинофилов и лимфоцитов. До и после перекрестов лейкограмма имеет псевдоэозинофильный тип, а внутри перекреста – лимфоцитарный. При дифференциальных подсчетах индекс соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов более информативен, чем изменение концентрации клеток. Значения индексаКребса отражают соотношение неспецифической и специфической резистентности, косвенно характеризуют активность фагоцитарных реакций и факторов специфического иммунитета, а также их участие в поддержании общей реактивности организма. Снижение индекса ниже нормативных значений свидетельствует об ингибировании процессов фагоцитоза, повышение – об инфекционной нагрузке на организм.

Ключевые слова: цыплята, нейтрофилы, лимфоциты, индекс Кребса.

DYNAMICS OF THE NEUTROPHILES AND LYMPHOCYTES RELATION INDEX IN THE CHICKENS BLOOD

Moiseeva Anna Anatolievna, junior researcher,
Prisnyi Andrey Andreevich, Doctor of Biology Sciences, leading researcher
Belgorod Department of All-Russian scientific research institute of experimental veterinary medicine named after Ya.R. Kovalenko, 308002 Russia, Belgorod, Kurskaya street, 4, phone: 8(4722) 26-29-75, e-mail: andreyprisny@gmail.com

Abstract. The study of the morphology and immunobiological properties of the blood of birds is an invariably topical aspect of modern veterinary hematology and immunology. This is due to the complex and

diverse functions that the blood performs in the body. In studies, one of the indirect physiological tests is widely used – the kinetics of the ratio of neutrophils and peripheral blood lymphocytes. When the state of stress develops, this indicator increases due to the release of neutrophils from the bone marrow into the bloodstream and migration of lymphocytes into the tissue. The aim was to study the dynamics of the index of the ratio of neutrophils and lymphocytes in the blood of chickens. The blood was taken by intracardiac puncture in the chickens of the cross "Hisex Brown" during the first twenty days of life. The leukocyte formula was determined by counting leukocytes in stained blood smears. The index of the ratio of neutrophils and lymphocytes (Krebs index) was calculated by the formula. The index of the ratio of neutrophils and lymphocytes obtained during the mathematical treatment of the leukogram took into account the repeated cross-section of the graphic curves of neutrophils and lymphocytes when analyzing age-related changes. The leukogram has a neutrophils type before and after crosshairs, and within the cross is lymphocyte. The ratio index of neutrophils and lymphocytes is more informative than the change in cell concentration in differential calculations. The values of the Krebs index reflect the ratio of nonspecific and specific resistance; indirectly characterize the activity of phagocytic reactions and specific immunity factors, as well as their participation in maintaining the overall reactivity of the organism. Decrease in the index below the normative values indicates inhibition of phagocytosis, increase – about the infectious on the organism.

Key words: chickens, neutrophils, lymphocytes, the Krebs index.

Необходимость исследования показателей крови сельскохозяйственной птицы определяется задачей, стоящей перед исследователями. В практическом птицеводстве и ветеринарии наиболее часто используются биохимические методы исследования. К изучению

морфологии крови прибегают значительно реже и, как правило, при проведении научно-исследовательских работ. Однако с каждым годом все более актуальной становится необходимость изучения морфологии и иммунобиологических свойств крови птиц. Это обусловлено теми сложными и многогранными функциями, которые выполняет кровь в организме (Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980).

В исследованиях, посвященных изучению стресса и адаптации птиц, широко используется один из косвенных физиологических тестов – кинетика величины соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов периферической крови. Установлено, что при развитии состояния стресса этот показатель увеличивается за счет абортивного выброса незрелых клеток псевдоэозинофилов из костного мозга в кровяное русло и миграции лимфоцитов из последнего в ткани. Причем, изменения величины соотношения псевдоэозинофилы/лимфоциты коррелируют со сдвигом концентрации кортикостерона в крови птиц и пропорциональны степени действия стресс-факторов различной природы (Забудский Ю.И., 2002). В связи с вышесказанным целью исследования было изучение динамики индекса соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов в крови цыплят.

Для осуществления исследования были отобраны суточные петушки кросса «Хайсекс Браун». Все подопытные цыплята получали рацион, сбалансированный по основным питательным и биологически активным веществам. В течение первых 20 суток жизни производили отбор крови путем внутрисердечной пункции. Полученную кровь стабилизировали 3,8% цитратом натрия. Лейкоцитарную формулу определяли путем подсчета лейкоцитов в окрашенных мазках крови (окраска по Романовскому-Гимзе).

Индекс соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов (индекс Кребса) рассчитывали по формуле (Угрюмов В.М., 1974; Забудский Ю.И., 1988; Ткаченко Е.А., Дерхо М.А., 2014):

$$ИК = \frac{ПЭ}{Л},$$

где ПЭ – псевдоэзинофилы, Л – лимфоциты.

Статистическая обработка цифрового материала проведена с использованием программы SPSS Statistic 17.0

Индекс Кребса относится к группе лейкоцитарных индексов неспецифической реактивности и характеризует участие псевдоэозинофилов и лимфоцитов в поддержании обшей реактивности организма, а также активности факторов специфического иммунитета и фагоцитарной реакции (Жуков А.П. с соавт., 2017). При оценке полученных результатов следует учитывать онтогенез лейкограммы у цыплят (рисунок 1).

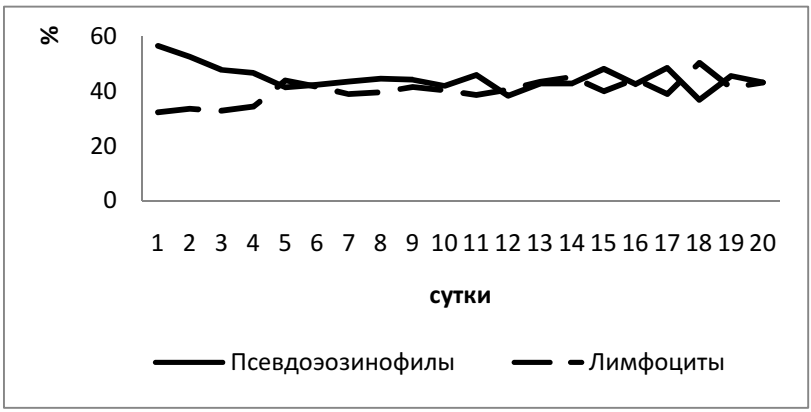


Рисунок 1 – Динамика содержания псевдоэозинофилов и лимфоцитов в крови цыплят в первые 20 суток жизни

При рождении количество нейтрофилов превышает представительство лимфоцитов, это отражается на индексе Кребса, который близок к двум условным единицам (рисунок 2).

Через 5 суток после рождения следует первый перекрест, когда в крови цыплят уже превалирует представительство лимфоцитов и индекс Кребса будет равен 0,97±0,08 условных единиц. В последующие сутки уровень индекса будет варьировать, с наименьшими значениями в 18-суточном возрасте, а у птиц в возрасте 20 суток индекс Кребса становится вновь близок к единице.

Рисунок 2 – Динамика значений индекса Кребса у цыплят в первые 20 суток жизни

Таким образом, при анализе возрастных изменений интегральных гематологических индексов, полученных при математической обработке лейкограммы, следует учитывать неоднократный перекрест кривых псевдоэозинофилов и лимфоцитов. До и после перекрестов лейкограмма имеет псевдоэозинофильный тип, а внутри перекреста –лимфоцитарный. При дифференциальных подсчетах референтные интегральные гематологические индексы более информативны, чем изменение концентрации клеток или «сдвиг влево».

При этом количество псевдоэозинофилов само по себе не является надежным прогностическим критерием (Козинец Г.И., Макаров В.А., 1997). В целом, значения индекса Кребса отражают соотношение неспецифической и специфической резистентности, косвенно характеризуют активность фагоцитарных реакций и факторов специфического иммунитета, а также их участие в поддержании общей реактивности организма. Снижение индекса ниже нормативных значений свидетельствует об ингибировании процессов фагоцитоза, повышение – об инфекционной нагрузке на организм.

Литература

1. Болотников, И.А. Гематология птиц / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев. – Л.: Наука, 1980. – 116 с.
2. Жуков, А.П. Возрастные изменения референтных интегральных гематологических индексов неспецифической реактивности у здоровых лошадей / А.П. Жуков, М.М. Жамбулов, А.П. Датский // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. –№ 5. (67).– С. 148-152.
3. Забудский, Ю.И. Современные методы диагностики состояния стресса у сельскохозяйственных птиц / Ю.И. Забудский // Труды III Международной Ирано-Российской конференции «Сельское хозяйство и природные ресурсы». – М.,2002. – С. 134-135.
4. Козинец, Г.И. Исследование системы крови в клинической практике / Г.И. Козинец, В.А. Макаров. – М.: Триада-Х, 1997. – С. 204-243.
5. Ткаченко, Е.А. Лейкоцитарные индексы при экспериментальной кадмиевой интоксикации мышей / Е.А. Ткаченко, М.А. Дерхо // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3 (47). – С. 81-83.
6. Угрюмов, В.М. Тяжелая закрытая травма черепа и головного мозга (диагностика и лечение) / В.М. Угрюмов. – М.: Медицина, 1974. – 328 с.

УДК 619:616

ЦИРКОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ СВИНЕЙ. ОБЗОРНЫЕ ДАННЫЕ. PORCINE CIRCOVIRUS DISEASE. A REVIEW.

В.В. Стаффорд, старший научный сотрудник
Я.Б. Стрельцова, аспирант
М.А. Аноятбеков, главный научный сотрудник
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН им.К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко
сектор патоморфологии
109428, г.Москва, ул. Рязанский пр-т, д.24, к.1
stafford.v.v@gmail.com
Stafford V.V., senior researcher
Streltsova Ya.B., post-graduate student
Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” Sector of Pathomorphology. 109428, Moscow, Ryazanskiy av. 24-1.

Аннотация. В кратком обзоре обобщены данные о цирковирусной болезни свиней. Приведены сведения о современной эпизоотической обстановке за рубежом и в Российской Федерации. Отражены вопросы диагностики заболевания, клинических и патологоанатомических проявлений. Бессимптомное течение заболевания у взрослого поголовья усугубляет эпизоотическую обстановку не только внутри стада, но и при перемещении животных между различными ареалами страны. Обнаруженный в 2015 году цирковирус свиней 3 типа свидетельствует о его эволюционном развитии, что стимулирует проведение молекулярно-биологических, иммунологических, эпизоотологических и патологоморфологических исследований.

Summary. The short review covers history of porcine circovirus disease. Current epizootic situation in the world and in the Russian Feder-

ation is summarized. Asymptomatic manifestation of the disease in the adult population is complicating for the epizootic studies within individual herds, and between different areas of the country. Discovered in 2015, PCV-3 is an evidence of the virus' continuous evolution that is particularly relevant for molecular biologic, immunological, epizootic and pathological and morphological studies.

Ключевые слова: цирковирусная болезнь свиней, ЦВС-2, ЦВС-3, синдром после отъемного мультисистемного истощения, синдром дерматита и нефропатии поросят, репродуктивный и респираторный синдром свиней, эпизоотология, диагностика.

Key words: postweaning multisystemic wasting of piglets, porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PCV-2, PCV-3, reproductive and respiratory syndrome.

Введение. Свиноводство относится к одной из активно развивающихся отраслей животноводства в России, и во всем мире. Негативным аспектом такого высокоинтенсивного развития данной отрасли является появление и распространение заболеваний свиней с различным этиологическим началом [13]. Одно из главных мест среди таких инфекций занимают цирковирусные болезни свиней (ЦВБС), симптомокомплекс которых проявляется рядом синдромов: после отъемного мультисистемного истощения (СПМИ); дерматита и нефропатии поросят (СДНП). В клинической диагностике данные синдромы проявляются энтеритом, пневмонией, репродуктивной дисфункцией, лимфаденитом, врожденным тремором [11].

Отечественными исследователями было установлено, что уровень инфицированности цирковирусом свиней 2 типа (ЦВС-2) при СПМИ достигает от 5 - 30 % (иногда 50-70 %). При грануломатозном энтерите и некротическом лимфадените, с которыми ассоциируют ЦВБС, заболеваемость составляет от 10 до 20 %, уровень летальности при этом достигает 60 %. При дерматите и синдроме

нефропатии поросят, ассоциированными с ЦВС-2, уровень заболеваемости может находиться в пределах 1 %, но уровень летальности при этом достигает 100 % [4, 5].

Этиология. Возбудитель цирковирусной болезни свиней относится к семейству *Circoviridae,* рода *Circovirus*, который в свою очередь делится на ЦВС-1, ЦВС-2 и ЦВС-3, генетически отличные друг от друга. Вирионы имеют безоболочечный икосаэндрически симметричный капсид, геном представлен в виде одноцепочечной кольцевой молекулы ДНК [2].

Распространение вируса. В 1990-х годах проводили ретроспективный анализ сыворотки крови и патологического материала за 1970 – 1997 год по всей Европе. Цирковирус второго типа регистрируется внутри свиноводческих хозяйств Бельгии с 1969 года. В Великобритании исследование патологических образцов органов поросят с СПМИ за 1970 - 90-е годы, показало наличие вирусной ДНК у 30 – 41 % животных. Ретроспективный анализ сывороток крови свиней из Ирландии с 1973 по 1988 год продемонстрировал серопозитивность к ЦВС-2 у 55 - 100 % животных. В Испании, Канаде и США ЦВС-2 циркулирует в хозяйствах с 1985 года [9]. Начиная с 2001 года, ЦВС-2 регистрируется среди свиноводческих хозяйств на территории Азии [9, 14]. В 2015 году на ферме в Северной Каролине (США) у свиноматок с хронической репродуктивной недостаточностью, и высокую смертностью их плодов с признаками характерными для СДНП, был обнаружен ЦВС-3. В настоящее время вирус выделен в стадах Китая, Южной Кореи, Польши, России, свидетельствуя о широком географическом распространении нового типа цирковируса [9, 10, 16].

Источником инфекции являются больные и инфицированные животные, возбудитель попадает в окружающую среду с естественными и патологическими выделениями организма, также возможно

внутриутробное инфицирование плода. [5]. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК ЦВС-2 была обнаружена в пищеварительном тракте свиней, доказывая оральную передачу вируса [4]. Нуклеиновая кислота ЦВС-2 может содержаться в сперме хряков, но половой путь передачи вируса вызывает споры в среде российских и зарубежных ученых [5].

Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации. В Российских хозяйствах серопозитивность варьирует от 55 - 100 %. На территории РФ согласно исследованиям, проводимым в стране, почти в каждом свиноводческом хозяйстве найден возбудитель цирковирусной инфекции ЦВС-2 [5].

За период с 2006-2012 год в Пермском крае было исследовано 245 проб сыворотки крови методом ИФА, из которых 73 пробы положительные [3].

При проведении серологического мониторинга в Удмуртской республике, инфицированность свинопоголовья ЦВС-2 в возрасте до 4 месяцев составила не более 50 %. При исследовании свиноматок, из 368 голов выявлено 71,2% положительно реагирующих на ЦВС-2. Среди 142 голов откормочных свиней 61,3 % были серопозитивны к ЦВС-2. Из 354 голов ремонтных свинок антитела к ЦВС-2 выявлялись у 46,9 % животных. Полученные данные подтверждают, что вирус циркулирует среди поголовья свиней всех возрастных категорий [3].

Из данных исследований проводимых в Ростовской области, установлена сезонность ЦВБС, пик заболеваемости приходится на зимне-весенний период, первый подъем наблюдается с декабря по апрель, второй подъем приходится на май, затем в июле заболеваемость резко снижается и держит низкий уровень до ноября [4].

Диагностику ЦВБС проводят на основе присутствия клинических признаков, наличия характерных патологических изменений при вскрытии. Полученный патологический материал исследуют

гистологическим методом [6]. В лимфоидной ткани выявляют антиген ЦВС-2 с использованием разнообразных современных методов - ПЦР, гибридизация in situ, иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлюоресценции и другие [1]. Для дифференциальной диагностики проводят иммуногистохимическое исследование, определяют вирусный тропизм к тканям и степень патологического процесса в них [7].

Взаимосвязь с другими инфекциями. Цирковирусная инфекция, часто находится в ассоциации с инфекциями, вызванными возбудителями трансмиссивного гастроэнтерита, парвовирусного энтерита, репродуктивного и респираторного синдрома (РРСС), пастереллеза, микоплазмоза и гельминтозами [3].

Об ассоциированности цирковирусных инфекций говорят и другие данные. В Ростовской области, исследования распространения ассоциированных болезней свиней при РРСС, в 2008 году, показали, что в 42,7% РРСС ассоциируют с цирковирусной коинфекцией. Дальнейшие исследования в Ростовской области, за 2006-2008 год выявили, что СПМИ ассоциирован с сопутствующими инфекциями: вирусом РРСС - 55 %, микоплазмами – 38%, иными возбудителями бактериальной пневмонии – 13% и только у 2,1% поросят ЦВС-2 встречался в виде моно-инфекции [4].

Заключение. Основываясь на эпизоотологических данных, можно сделать вывод, о том, что ЦВБС является одной из самых распространенных вирусных болезней в свиноводческих хозяйствах, способствует повышению показателя летальности, особенно среди поголовья молодняка. Заболевание чаще встречается в комплексе с другими вирусными, бактериальными инфекциями и паразитарными инвазиями. На фоне низкой резистентности молодого организма и развития вторичной микрофлоры, диагностика заболевания крайне затруднительна из-за широкого разнообразия клинических признаков

болезни. Необходима комплексная диагностика, которая отражает состояние инфицированного организма, показывает не только наличие возбудителя, но и определяет его тропизм и диссеминацию [12].

Несмотря на невысокую смертность взрослого поголовья свиней, возбудитель, циркулируя в стаде, создает условия для ослабления иммунитета и тем самым наносит ощутимый ущерб хозяйству. В таких условиях необходим строгий контроль распространения цирковирусной инфекции свиней и применение геоинформационных систем, которые в значительной мере могли бы определить эпизоотические очаги заболевания, пути предотвращения распространения инфекции и рассчитать экономические риски [8, 15].

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг., по заданию №0578–2015-0001 «Разработать методические пособия по применению непрямого иммуногистохимического исследования в органах и тканях свиней для диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней и цирковирусной инфекции свиней 2 типа», № 0578-2014-0027 «Разработать тест-систему для выявления возбудителя энзоотической пневмонии свиней методом ПЦР».

Финансирование работы было получено в рамках Государственного задания из федерального бюджета без привлечения дополнительных источников финансирования. Авторы данной публикации подтверждают отсутствие каких-либо конфликтов интересов.

Литература

1.Гребенникова, Т.В. Средства лабораторной диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней / Т.В. Гребенникова, А.Д. Забережный, Е.А. Непоклонов, О.А. Верховский, Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер // Ветеринария. — 2005. — № 10. — С. 24-26.

2.Забережный, А.Д. Современная таксономия вируса / А.Д. Забережный, Л.В. Костина, А.Г. Южаков, И.А. Гулюкина, Т.В. Степанова, В.В. Стаффорд, И.В. Полякова, Е.И. Дроздова // Ветеринария и кормление. — 2017. — №1. — С. 4-13.

3.Калимуллина, В.Р. Роль цирковирусной инфекции в инфекционной патологии свиней на территории Пермского края/ В.Р. Калимуллина, О.Г. Петрова // Аграрный вестник Урала. — 2013. — № 4(110). — С. 16-18.

4.Карташов, С.Н. Эпизоотические особенности цирковирусной инфекции свиней в условиях Ростовской области / С.Н. Карташов, А.М. Ермаков, А.Г. Ключников, А.И. Бутенков, Д.А. Андреев // Ветеринария Кубани. — 2009. — №5. — С. 4-7.

5.Орлянкин Б. Г., Алипер Т. И., Непоклонов Е. А. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика // Ветеринария. 2005. № 11. С. 3–6.

6.Стаффорд, В.В. Патоморфологические изменения паренхиматозных органов поросят, экспериментально зараженных вирусом репродуктивно - респираторного синдрома и цирковирусом свиней типа 2 / В.В. Стаффорд, А.Д. Забережный, М.И. Гулюкин // Ветеринария. — 2016. — №9. — С. 24-27.

7.Стаффорд, В.В. Методические указания иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа / В.В. Стаффорд, С.А. Раев, Я.Б. Стрельцова, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный, А.М. Гулюкин // ООО «Агентство творческих технологий». – 2018. – С. 1- 19.

8.Шабейкин, А.А. Опыт использования ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании / А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина // В сборнике трудов V Международного ветеринарного конгресса, Москва, 22-24 апреля 2015 г. — С. 250-252.

9.Rachel Palinski A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure/ Rachel Palinski, Pablo Piñeyro, Pengcheng Shang, Fangfeng Yuan, Rui Guo, Ying Fang, Emily Byers, Ben M. Hause. // J Virol. — 2017. — Vol. 1. — P. 16.

10.Shao-Lun Zhai Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations/ Shao-Lun Zhai, Xia Zhou, He Zhang, Ben M. Hause, Tao Lin, Runxia Liu, Qin-Ling Chen, Wen-Kang Wei, Dian-Hong Lv, Xiao-Hui Wen, Feng Li, Dan Wang. // Virol J. — 2017. — Vol. 14. — P. 222.

11.Stafford, V.V. Second type of pigs' circovirus infection/ Stafford V.V.// Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. — 2017. — T. 65. — №5. — P. 306-309.

12.Stafford, V.V. Application of immunohistochemestry in diagnostics / V.V. Stafford // Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. — 2016. — T. 56. — №8. — P. 18-21.

13.Vlasova A. Molecular epidemiology of classical swine fever in the Russian Federation / Vlasova A., Grebennikova T., Zaberezhny A., Aliper T., Nepoklonov E., Greiser-Wilke I., Floegel-Niesmann G., Kurinnov V. // Journal of Veterinary Medicine, Series B. — 2003. — T. 50. — № 8. — С. 363-367.

14.Yamamoto, E Complete genome sequence of pigeon circovirus detected in racing pigeons in western Japan/ Yamamoto E, Ito H, Kitamoto E, Morinishi K, Yano A, Miyoshi S, Ito T. // Virus Genes. — 2015. — Vol. 51. — P. 140-143.

15.Vedernikov, V.A. Summary of Rabies in the Russian Federation. Particularities of the Present Situation / V.A. Vedernikov, V.A. Sedov, I.V. Baldina, A.M. Gulyukin et al. // Rabies Bulletin Europe. 1999. — V. 23. — №. 4 — P. 13-15.

16.Yuzhakov AG, Raev SA, Alekseev KP, Grebennikova TV, Verkhovsky OA, Zaberezhny AD, Aliper TI. First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia. Virus Genes. 2018 Aug;54(4):608-611.

619:616.993

ПЕРЕКРЕСТНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРОСТЕЙШИМИ РОДА GIARDIASP., ВЫДЕЛЕННЫМИ ОТ СОБАК И КОШЕК.

Курносова О.П. [1] Успенский А.В. [2]

[1]кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов, e-mail: 916952522@mail.ru

[2]профессор, доктор ветеринарных наук, заведующий лаборатории паразитарных зоонозов, e-mail: 916952522@mail.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений-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», Россия, Москва, Большая Черемушкинская ул., 28, 117218, 8(499)1245655

Резюме. Гиардиоз является широко распространенным среди животных протозойным заболеванием. Возможность перекрестного заражения гиардиями, выделенными от домашних собак и кошеклабораторных крыс является актуальной темой. Разновозрастные группы крыс заражали перорально разными дозами цист гиардий. Исследования показали, что препатентный период варьировал от 17 до 30 дней, патентный от 30 до 520 дней. Клинические проявления у всех лабораторных животных были минимальными и характеризовались размягчённым стулом. Цисты гиардий у зараженных крыс выделялись периодически во внешнюю среду с разной интенсивностью инвазии. Успех создания лабораторной модели гиардиоза на лабора-

торных крысах зависит не только от генотипа гиардий и их инвазионной способности, но и от индивидуальной восприимчивости лабораторных животных. Не смотря на трудоемкость создания лабораторной модели гиардиоза и наблюдения за ходом инвазии у опытных животных, успешное заражение позволяет проводить различные исследования в условиях in vivo и vitro и сохранять в жизнеспособном состоянии различные изоляты гиардий.

Ключевые слова: гиардии, заражение лабораторных крыс, собаки, кошки, лабораторная модель

Cross-infection of laboratory rats with the protozoa Giardia sp. separated from dogs and cats.

Kurnosova O.P., Uspensky A.V.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin - Branch of the Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center - All Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko the Russian Academy of Sciences», 28, Bolshaya Cheremushkinskaya street, Moscow, Russia, 117218, 8(499)1245655

Summary. Hyardiosis is a widespread protozoal disease among animals. The possibility of cross-contamination with giardia, between different species of animals is an actual topic that will help to clarify many issues in the field of epizootiology and epidemiology of this disease.

Different-aged groups of rats were orally infected with different doses of giardia cysts, isolated from domestic dogs and cats. Studies have shown that the prepatent period ranged from 17 to 30 days, the patent period from 30 to 520 days. Clinical manifestations in all laboratory animals were minimal and characterized by a softened stool. Cysts of giardias in infected rats were periodically released into the external environment with different rates of invasion. The success of the creation

of a laboratory model of giardiosis on laboratory rats depends not only on the giardia genotype and their invasive ability, but also on the individual susceptibility of laboratory animals. Despite the labor input of creating a laboratory model of giardiosis and monitoring the progress of invasion in experimental animals, successful infection allows various studies to be carried out in vivo and vitro and to preserve various Giardia isolates in a viable state.

Key words: giardia, infection of laboratory rats, dogs, cats, laboratory model.

Введение. Гиардиоз – широко распространенное заболевание, вызываемое паразитированием в тонком кишечнике животных, птиц и людей жгутиковых простейших *Giardiasp.* Клинические признаки заболевания могут сильно варьировать. Степень выраженности гиардиоза зависит от ряда предрасполагающих факторов как со стороны организма хозяина, так и от степени вирулентности генотипов гиардий. Известно, что наиболее восприимчивы животные в возрасте до 1 года. Состояние пониженного иммунитета организма, наличие других заболеваний, снижающих защитные способности слизистой оболочки тонкого кишечника, могут привести к затяжному течению болезни. В ряде случаев отмечают длительное носительство гиардий. Вместе с этим известны случаи бессимптомного переболевания и самопроизвольного освобождения от гиардий.

На сегодняшний день гиардиоз как заболевание и сами гиардии активно и всесторонне изучаются по всему миру [1, 3,4,5,7,9]. Но, не смотря на это, до сих пор по некоторым направлениям остаются актуальные вопросы. В эпидемиологии гиардиоза остается открытым вопрос о зоонозной передаче этих простейших от животных к человеку. Генетические исследования показали, что гиардии *Giardialamblia* генотипа А и В способны вызывать заражение не только людей, но и многих видов животных, что позволяет предположить их

потенциальную роль в передачи инвазии человеку [9]. Этот факт необходимо учитывать при тесном контакте человека с домашними животными, особенно при не соблюдении правил личной гигиены.

Успешное экспериментальное заражение гиардиями лабораторных животных имеет очень большое значение для науки и практики [10]. Это поможет проводить целый ряд различных исследований по выявлению биологических особенностей разных изолятов лямблий в организме зараженного животного, изучать клинические проявления инвазии в чистом эксперименте, позволит провести оценку эффективности новых лекарственных форм для терапии гиардиоза в условиях in vivo. Для экспериментального заражения исследователи используют разных животных, однако, наиболее подходящей моделью являются лабораторные мыши, крысы и монгольские песчанки [8].

Целью представленной работы было: 1) оценить вероятность перекрестного заражения гиардиями, изолированными от домашних животных для лабораторных крыс; 2) определить длительность препатентного и патентного периодов при экспериментальном заражении; 3) изучить характер выделения цист во внешнюю среду за весь период эксперимента; 4) оценить перспективность использования крыс как лабораторной модели гиардиоза.

Материалы и методы. Для экспериментального заражения использовали цисты гиардий, которые выделяли из фекалий спонтанно домашних собак и кошек. Изоляты цист от животных были любезно предоставлены ветеринарной лабораторией «Пастер».

Цисты из положительных образцов фекалий выделяли с помощью флотационного метода с использованием раствора хлорида натрия, плотностью 1,2 [2]. Капли с цистами гиардий гельминтологической петлей переносили с поверхности пленки на предметное стекло, затем, со стекла смывали цисты в пробирки типа эппендорф и

центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3-х минут. Надосадочную жидкость отбирали пипеткой, к осадку добавляли дистиллированную воду и повторяли центрифугирование. Количество цист подсчитывали после окрашивания 2% раствором Люголя при увеличении микроскопа ×400, подсчет цист вели во всех полях зрения [1].

Белые нелинейные крысы были получены из питомника «Андреевка» ФГБУН НЦБМН России. Перед началом опыта крыс многократно ежедневно исследовали методом концентрации фекалий на наличие кишечных паразитов и свободные от них животные были отобраны для опыта [6]. Все животные содержались в индивидуальных клетках, в условиях, исключающих спонтанное заражение гиардиями.

Экспериментальных животных заражали разными дозами (от 800 цист до 45 000 цист на голову). Контрольные крысы перорально получили по 20 мкл кипяченой воды.

С первого дня после заражения, ежедневно у всех животных методом флотации исследовали фекалии на наличие цист лямблий для определения начала препатентного периода. С наступлением патентного периода частоту исследований сократили до одного раза в неделю. После самопроизвольного прекращения выделения цист, фекалии животных продолжали исследовать в течение 3-х недель, и при отсутствии цист в этот период опыт считали законченным.

Для определения интенсивности инвазии 1 г фекалий исследовали методом эфирно-формалинового осаждения, осадок окрашивали 2% раствором Люголя и при увеличении микроскопа ×400 вели полный подсчет цист во всех полях зрения [6].

Результаты и обсуждение. Всего проведено 10 опытов по перекрестному заражению лабораторных крыс. Результаты представлены в таблице №1.Возраст и соответственно масса тела лабораторных крыс были различными. Изначально в опытах использовали молодых

животных, выбор которых был обоснован биологическими особенностями гиардий, способных интенсивно размножаться в условиях хорошего пристеночного пищеварения. Но с течением времени проведения опытов была проведена попытка заражения лабораторных крыс меньшей дозой цист и более старшего возраста.

Таблица №1. Результаты опытов по заражению крыс изолятами гиардий, выделенных от собак и кошек.

Кол-во опытов	Доза заражения (кол-во цист на голову)	Кол-во крыс в опыте	Кол-во заразившихся крыс в опыте	Длительность препатентного периода (дни)	Длительность патентного периода (дни)	Длительность наблюдения (всего дней)	Характер выделения цист
№1 от собаки	3-10 тыс	3	0	-	-	30	-
№2 от собаки	2,6-5 тыс	3	0	-	-	30	-
№3 от собаки	18-45 тыс	4	4	17-25	520	537*	прерывистый
№4 от собаки	5,6-11,2 тыс	5	0	-	-	30	-
№5 от собаки	800 -1,6 тыс	6	0	0	0	30	-
№6 от собаки	5 тыс	4	4	25	95	120	прерывистый
№7 от собаки	5-18 тыс	5	5	19-21	30	55*	прерывистый
№8 от собаки	5 тыс	4	0	-	-	30	-
№9 от кошки	5-6 тыс	2	2	30	150	180*	прерывистый
№10 от кошки	4 тыс	4	0	-	-	30	-

* - звездочкой отмечено количество дней наблюдения за выделением цист при самопроизвольном освобождении от гиардий

Из 8 опытов (№1-№8) по заражению изолятами от собак, в 3 случаях все крысы в опытной группе были успешно заражены. Препатентный период длился от 17 до 25 дней, патентный период - от 30 до 520 дней. Из 2 опытов (№9-№10) при заражении крыс изолятами гиардий, выделенных от кошек, только в 1 случае крысы успешно

заразились (№9). Препатентный период длился 30 дней, патентный 150 дней. Во всех опытах у животных наблюдался прерывистый характер выделения цист с фекалиями во внешнюю среду, интенсивность инвазии варьировала - от 10 до 5500 цист на 1 грамм фекалий. Клинические проявления гиардиоза у зараженных животных были отмечены только со стороны желудочно-кишечного тракта и проявлялись в виде периодически возникающего неоформленного стула или увеличения объема и размягчения фекальных масс.

Обсуждение. Для проведения перекрестного заражения исследователи в своих опытах используют разное количество цист и трофозоитов, от 7-10 цист до 1,5 миллионов трофозоитов на одно животное [5,8]. В нашем исследовании для заражения крыс также использовалось разное количество цист (от 800 цист до 45000 цист на одно животное). Максимально большое количество цист для заражения было использовано в начале экспериментов для увеличения шанса осуществить экспериментальное перекрестное заражение с одной стороны, с другой стороны использование меньшего количества цист (минимально 800 цист на одно животное) было связано с интенсивностью инвазии гиардиями у спонтанно зараженного животного, из фекалий которого выделяли инвазионный материал. Также, в начале исследований, заражению подвергали молодых крыс, основываясь на биологии гиардий, способных наиболее интенсивно размножаться в условиях хорошего пристеночного пищеварения [7] . Но, по мере выполнения исследований, в дальнейшем для заражения были также использованы и взрослые крысы, в возрасте одного года и более.

Вопрос о существовании перекрестного заражения гиардиями между разными видами животных и вероятность их зоонозной природы для человека интересует исследователей по всему миру очень давно. [5,7,8,10]. Генетическая идентичность изолятовгиардий, выде-

ленных от человека и животных является достаточным основанием считать данного возбудителя зоонозом [9]. Но, не смотря на потенциальный зоонозный характер инвазии, условия, необходимые для передачи от животных к человеку во многом остаются неясными. Животные в таком случае могут быть резервуаром инвазии, и степень опасности для передачи паразита к человеку будет сильно зависеть от условий проживания людей. Это в первую очередь является актуальным вопросом для тех стран и регионов, где отсутствует централизованное водоснабжение и отведение сточных вод. В то время, передача данной инвазии, даже при наличии общего генотипа, людям, проживающим в условиях мегаполисов с хорошей социальной урбанизацией будет минимальна. В таких условиях группу риска будут представлять люди, чья профессия вязана с уходом за большим количеством животных и дети маленького возраста с несформированными навыками личной гигиены.

В представленной работе была сделана попытка экспериментального заражения лабораторных крыс изолятами гиардий, выделенными от спонтанного зараженных домашних собак и кошек. Исследование показало наличие возможности перекрестного заражения. Следует учитывать, что эксперименты достаточно трудоемки, требуют длительного и кропотливого наблюдения. Успех создания лабораторной модели на животных может зависеть не только от используемого для заражения генотипа гиардий, но и от жизнеспособности и инвазионности цист, от индивидуальной восприимчивости лабораторных животных [5].

Исследования подобного плана являются весьма актуальными и дают возможность расширить представления в области раскрытия потенциально зоонозной опасности данного заболевания для человека. Помимо этого создание лабораторных моделей гиардиоза на кры-

сах позволит проводить широкий круг исследований в условиях in vivo и in vitro.

Литература

1.Ириков О.А. Проблемы выделения культуры лямблий, Мед.паразитол, 2008 1, 50-51.

2.Котельников Г.А.//Диагностика гельминтозов животных. – М., 1974.

3.Курносова О.П., Одоевская И.М., Красавченко К.С. Определение генотиповLambliaduodenalisy инвазированных лямблиями людей в городе Москва, Мед.паразитол., 2015,3, 21-24.

4.КурносоваО.П. Распространение простейших Lambliasp. (Giardiasp среди собак и кошек города Москвы Мед.паразитол

5.Курносова О.П., Одоевская И.М. Экспериментальное заражение крыс изолятами лямблий от человека – модель длительного течения инфекции Мед.паразитол 2016. 2, 16-19

6.Лабораторная диагностика гельминтозов и протозоозов, МУК 4.2.3145-13. – М., 2014.http://docs.cntd.ru/document/1200110752.

7.Adam R.D. Biology of Giardia lamblia, ClinicalMicrobiol. Reviews, 2001, 14, 447-475.

8.Tantawattananon N., Sangloung C., Buddhirongawatr R., Sukthana Y. Cultivation of Giardia duodenalis in Mongolian gerbils, Southeast Asian J Trop Med Public Health., 2006, 37, 21-23.

9.Thompson R.C., Monis P.T. Variation in Giardia: implications for taxonomy and epidemiology, Adv. Parasitol., 2004 ,5869-137.

10.Zak O., Sande M.A. Handbook of animal models of infection, Academic press, 1999, 867-872.

УДК619:616.98:578.842.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ МРНК ЦИТОКИНОВ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Чугреева А.В., микробиолог лаборатории Молекулярной вирусологии.

Кольцов А.Ю., к.б.н., научный сотрудник лаборатории Арбовирусных инфекций.

Кольцова Г.С., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории Молекулярной вирусологии.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, 601125, пос. Вольгинский, Россия, (4922) 37-92-51

Аннотация. Африканская чума свиней (АЧС) - одна из наиболее опасных вирусных болезней домашних и диких свиней. Контроль АЧС осложняется отсутствием вакцин. Штаммы вируса АЧС могут существенно отличаться по своим генетическим и биологическим характеристикам, обладать разной степенью патогенности. Иммунный ответ организма при АЧС существенно зависит от штамма вируса. Цитокиновый статус животного является одной из важнейших характеристик иммунного ответа. Для более детального понимания механизмов развития патологических изменений при АЧС и формирования протективного иммунного ответа необходимо изучение цитокинового профиля животных, инфицированных различными штаммами вируса.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) широко используется для количественной оценки экспрессии цитокинов в клетках. Благодаря своей высокой чувствительности данный метод позволяет выявлять даже незначительное увеличение мРНК цитокинов. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов, таких как TNF-a, ин-

терфероны и хемокины, вероятно играет важную роль в патологии АЧС. В данной работе представлены результаты создания систем для определения уровня мРНК двух важных провоспалительных цитокинов (IFN-γ и TNF-α).

Ключевые слова: африканская чума свиней, цитокины, IFN-γ, TNF-α.

DETECTION OF THE PORCINE CYTOKINES MRNA LEVEL BY REAL-TIME RT-PCR

Chugreeva A.V., Koltsov A.U., Koltsova G.S.

Federal Research Center of Virology and Microbiology, 601125, Volginsky, Russia,(4922) 37-92-51

Abstract. African swine fever virus (ASFV) is the etiological agent of a contagious and often lethal disease of domestic pigs that has significant economic consequences for the swine industry. The control of African Swine Fever (ASF) has been hampered by the unavailability of vaccines. The ASFV strains have different genetic and biological characteristics, degree of pathogenicity. The immune response with ASF significantly depends of the strain of the virus. The cytokine status is one of the most important characteristics of an immune response. For a better understanding of the functional properties of immune cells the analysis of cytokine profiles of animals infected with different ASFV strains is of fundamental importance.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is widely applied to quantify the expression of cytokines in cells from various sources. The real-time PCR methods permit the sensitive detection and accurate quantification of cytokine mRNAs, which are sometimes expressed at very low levels in the target cells. An increase in the level of proinflammatory cytokines, such as TNF-a, interferons and chemokines, probably plays an important role in the pathology of ASF. We have established an easy real-time PCR assay, which allows the precise quantifica-

tion of changes in the expression level of 2 porcine pro-inflammatory cytokines (IFN-γ and TNF-α), and 2 housekeeping genes.

Key words: African Swine Fever, cytokines, IFN-γ, TNF-α.

Африканская чума свиней - одна из наиболее опасных вирусных болезней домашних и диких свиней. Возбудителем болезни является большой, оболочечный и сложноорганизованный ДНК-содержащий вирус из рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae* (Dixon,etal., 2000).

Для штаммов вируса АЧС характерна чрезвычайная генетическая гетерогенность, они могут существенно отличаться по своим биологическим характеристикам, обладать разной степенью патогенности. Несмотря на многолетние исследования и особый интерес ученых, защитный иммунитет при АЧС недостаточно охарактеризован. Иммунный ответ организма при АЧС существенно зависит от штамма вируса, вследствие чего результаты экспериментов зачастую бывают противоречивы. Одной из важнейших характеристик иммунного ответа является цитокиновый статус.

Цитокины образуют сложную сеть взаимодействий, а нарушение цитокинового ответа играет ключевую роль при многих вирусных инфекциях. Уровень отдельных цитокинов или цитокиновый профиль животного зачастую коррелирует с формой течения и исходом болезни. Многими исследователями было отмечено, что значительное увеличение ряда провоспалительных цитокинов («цитокиновый шторм») сопряжено с развитием геморрагических поражений и летальным исходом при различных геморрагических лихорадках (Bray M., 2005).

Ряд экспериментов продемонстрировал увеличение уровня провоспалительных цитокинов, таких как TNF-a, IFNs и хемокины, и при АЧС. Большинство исследователей пришло к выводу о важной роли TNF-α во время инфекции вирусом АЧС. Фактор некроза опу-

холи альфа (TNF-α) – основной провоспалительный цитокин, важный фактор защиты от внутриклеточных паразитов и вирусов, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами. Его влияние на клетки крайне велико, он модулирует липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия, активирует лейкоциты. Кроме того, TNF-α стимулирует продукцию других провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-8, IFN-γ), стимулируя дальнейшее формирование воспалительного иммунного ответа (Koj, 2008). Вероятно, что резкое и значительное повышение его уровня приводит к сосудистым повреждениям и кровоизлияниями при АЧС. Однако, отмечено, что уровень данного цитокина повышается при инфицировании как вирулентными, так и аттенуированными вариантами вируса (Afonsoetal., 2004; Giletal., 2008; Giletal. al., 2003; Zhangetal., 2006).

Семейство интерферонов (IFN) одно из наиболее важных мультифункциональных семейств иммунорегуляторных белков. Интерфероны I типа (IFN-α, IFN-β, IFN-ω) вырабатываются непосредственно в ответ на внедрение вирусов, после чего могут частично подавлять вирусную репликацию и ограничивают распространение вирусного потомства. IFN-γ индуцирует экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости I и II типов (MHC-I и MHC-II), обеспечивающих эффективную презентацию антигенов. Вероятно, именно система интерферонов ограничивает репликацию вируса АЧС и связана с формированием защиты. Кроме того, именно профили интерферонов существенно отличаются у животных, инфицированных вирулентными и аттенуированными штаммами вируса АЧС (Giletal., 2008).

Таким образом, создание тест-систем для количественного определения мРНК провоспалительных цитокинов свиней, таких как TNF-α и интерфероны, методом ПЦР в режиме реального времени

является актуальной задачей. Сравнение профилей цитокинов при различных формах АЧС позволит определить ключевые факторы цитокинового ответа, потенциально характеризующие степень патогенности вируса.

Целью данной являлась разработка систем детекциим РНК цитокинов свиней (фактор некроза опухоли α и интерферонγ) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

В работе были использованы первичная культура макрофагов свиней и перевиваемая культура клеток почки поросенка РК15. Выделение РНК проводили с использованием реагента QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Для постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор CFX Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Для ПЦР в режиме реального времени была выбрана технология гибридизационных зондов Taq Man. Олигонуклеотидные праймеры и Taq Man зонды были комплиментарны белок-кодирующим областям генов цитокинов (IFN-γ и TNF-α). Праймеры, которые использовались для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени, фланкировали участок в 102 п.н. мРНК IFN-γ, 128 п.н. и 222 п.н. мРНК TNF-α. Вторая система олигонуклеотидных праймеров для выявления мРНК TNF-α была разработана с целью исключения ложноположительных результатов в результате выявления геномной ДНК. Для детекции использовали зонды, несущие флуорофоры HEX и FAM соответственно. В качестве референтных генов (эндогенный контроль) были выбраны гены Beta-Actin и GAPDH, которые наиболее часто используются для нормализации количественных ОТ-ПЦР.

В результате исследований методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени различных культур клеток (РК15, макрофагов свиней) мРНК IFN-γ и TNF-α была выявлена через 4-8 часов после добавления Конканавалина А. При использовании нуклеотидных праймеров,

фланкирующих участокм РНК TNF-α длинной 128 п.н., наблюдали образование специфических продуктов в контрольных пробах, для которых не проводили ОТ. Это было обусловлено частичной контаминацией проб РНК геномной ДНК. Однако при сопоставлении результатов, полученных для проб без постановки обратной транскрипции, с результатами, соответствующими этим же пробам при проведении ОТ, разница составила более 12 циклов ПЦР ($\Delta Cq>12$). Это соответствует различию в концентрациях исходных матриц более чем в 10000 раз. Такая разница допустима в данном анализе и позволяет проводить расчёт уровней экспрессии данных генов.

Выбор эндогенного контроля (Beta-Actin и GAPDH) не влиял на пороговые значения Cq при мультиплексировании системы. Поэтому обе предложенные системы в равной степени можно использовать для определения относительного уровня экспрессии генов цитокинов.

Для количественного определения мРНК IFN-γи TNF-α фрагменты данных генов были заклонированы в плазмидный вектор pGEMR-T Easy Vector (Promega). Очистку ПЦР-продуктов из агарозного геля проводили с использованием набора Cleanup Standard (Евроген), а реакцию лигирования с использованием pGem R-T Easy Vector System (Promega). Полученные плазмиды использовали в качестве ДНК стандартов в ПЦР.

Таким образом, в результате исследований были разработаны тест-системы для определения уровня мРНКIFN-γ и TNF-α. Данные тест-системы в будущем будут дополнены системами для определения других важных цитокинов свиней и использованы для определения цитокинового профиля животных и культур клеток, инфицированных различными штаммами вируса АЧС. Такие данные необходимы для более детального понимания механизмов развития

патологических изменений при АЧС, формирования протективного иммунного ответа и разработки средств терапии болезни.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-00100.

Литература

African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response / C.L.Afonso, M.E.Piccone, K.M.Zaffuto, J.Neilan, G.F.Kutish, Z.Lu, C.A.Balinsky, T.R.Gibb, T.J.Bean, L.Zsak, D.L.Rock // Journal of virology. - 2004. – №78. – P. 1858-1864.

Bray M. Pathogenesis of viral hemorrhagic fever // CurrOpinImmunol. – 2005. – №17. – P. 399–403.

Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence / S. Gil, M. Spagnuolo-Weaver, A. Canals, N. Sepulveda, J. Oliveira, A. Aleixo, G. Allan, A. Leitao, C.L. Martins // Archives of virology. -2003. – №148. – P. 2077-2097.

Family Asfarviridae,L.K.Dixon, J.V.Costa, J.M.Escribano, D.L.Rock, E.Vinuela, P.J.Wilkinson. – London: Academic Press, 2000. - pp. 159-165.

Koj A. From the obscure and mysterious acute phase response to toll-like receptors and the cytokine network // Current Immunology Reviews. - 2008. - №4. - P. 199-214.

Macrophage transcriptional responses following in vitro infection with a highly virulent African swine fever virus isolate / F.Zhang, P.Hopwood, C.C.Abrams, A.Downing, F.Murray, R.Talbot, A.Archibald, S.Lowden, L.K.Dixon// Journal of virology. – 2006. - №80. –P. 10514-10521.

The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFNalpha, TNFalpha and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60 / S. Gil, N. Sepulveda, E. Albina, A. Leitao, C. Martins // Archives of virology. - 2008. –№153. – P. 1845-1854.

УДК 619: 616-036.22

ОЦЕНКА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА ТОКСОПЛАЗМОЗА В УСЛОВИЯХ МЕГАПОЛИСА

Шабейкин А.А., к.в.н. viev@mail.ru

Филимонова А.Д.

Паршикова А.В.

Шашурина Т.Е.

Гришина Е. Е.

ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук».

109428, Москва, Рязанский просп. Д. 24 корп. 1.

Аннотация. Частота встречаемости токсоплазмоза в популяции кошек московского региона составляет не менее 17 %, что сопоставимо с мировой статистикой распространенности токсоплазмоза в крупных мегаполисах. Однако, животные, содержащиеся в городских квартирах, крайне редко выделяют ооцисты с фекалиями и в большинстве случаев не представляют реальной угрозы для окружающих.

Ключевые слова: Toxoplasmagondii, жизненный цикл токсоплазмы, распространенность токсоплазмоза, московский мегаполис, ИФА, ПЦР.

Assessment of epizootic situation and epidemiological risk of toxoplasmosis in megapolis.

Shabeykin A. A, Filimonova A. D., Parshikova A.V., Shashurina T.E. Grishina E.E.

FGBNU "Federal research center All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko" 109428, Moscow, Ryazanskiyprosp. D. 24 corp. 1.

Summary. The frequency of toxoplasmosis in the cat population of the Moscow region is not less than 17 %, which is comparable with the world statistics on the prevalence of toxoplasmosis in large metropolitan areas. However, animals in city apartments rarely secrete oocytes in the faeces and in most cases do not constitute a real menace to others.

Key words: Toxoplasma gondii, life cycle of toxoplasma, prevalence of toxoplasmosis, Moscow megapolis, ELISA, PCR.

Введение. Возбудителем токсоплазмоза является облигатный внутри клеточный паразит, представитель вида Toxoplasma gondii, который относится к роду Toxoplasma, семейству Sarcocystidae, подотряду Eimeriorina, отряду Eucoccidiorida, классу Coccidia, типу Apicomplexa.

Toxoplasmagondii является наиболее распространенным зоонозным паразитом в мире. Обнаруживается почти на всех континентах, у всех теплокровных животных и является частой причиной заболевания диких, домашних животных и человека (Dubey, 2010), (Kärt Must, 2017). Считается, что инфицированию токсоплазмами подвергается до половины населения земного шара (VeronesiF, 2017).

Жизненный цикл развития Toxoplasmagondii включает фазы полового и бесполого размножения. Половое размножение паразитов происходит в эпителиальных клетках кишечника дефинитивных хозяев, которыми являются животные семейства кошачьих, причем, наибольшее эпизоотологическое и эпидемиологическое значение приходится на домашних кошек (Ricardo T. Gazzinelli, 2014) (MüllerUB, 2016). Бесполое размножение паразита проходит в орга-

низме промежуточных хозяев, в роли которого может выступить практически любое теплокровное животное. Специфика этой стадии заключается в отсутствии выделения паразита во внешнюю среду весь период инвазии. Поэтому истинными промежуточными хозяевами являются различные виды грызунов, которые служат регулярным звеном в пищевой цепи кошачьих. Остальные животные, включая человека, являются случайными, нецелевыми жертвами.

В организме кошки токсоплазмоз может протекать по половому и по бесполому пути развития, что является важной эпизоотологической особенностью данного возбудителя, которую необходимо учитывать при выявлении заболевших животных.

При половом цикле развития, токсоплазмы в эпителии кишечника кошки образуют гаметоциты, которые после слияния и ряда преобразований формируют не спорулированные ооцисты. Ооцисты с фекалиями попадают во внешнюю среду и до окончания процесса споруляции не являются инфекционно опасными. Споруляция при +4º С происходит за 2-3 дня, при +11ºС — за 5-8 дней, при +15ºС — за 14-21 день (Васильев, 2003). После окончания процесса споруляции ооцисты приобретают способность к инфицированию и могут сохраняться в почве до одного года и более. Наиболее длительный период выделения ооцист наблюдается у первично инфицированных, как правило, молодых животных, который составляет от 1 до 3 недель. Дальнейшая экскреция токсоплазм прекращается в результате формирования иммунной защиты у зараженного животного, которая обеспечивается резидентными макрофагами, дендритными клетками и внутриэпителиальными лимфоцитами. (Christopher A. Hunter, 2012). Повторное заражение кошки с выделением ооцист возможно не ранее чем через 4-6 месяцев (Ермакова, 2012). Но, как правило, продолжительность иммунной защиты от повторной инвазии и последующей экскреции ооцисту большинства животных (90%) сохра-

няется около 12 месяцев, а у части животных (25% - 33,4%)может сохраняться до 24 и 36 месяцев (Zulpo, etal., 2018). При повторном и последующем контактах кошки с токсоплазмами, в случае, если одновременно животное не болеет ретровирусными инфекциями, продолжительность периода выделения ооцист значительно сокращается и наблюдается с 1 по 3 день после поедания кошкой зараженной мыши (Marie-Lazarine Poulle, 2016). Однако, уровень и продолжительность экскрециооцист при повторном инфицировании находятся в зависимости от разновидности штамма T. Gondii и эти показатели значительно выше в случае соприкосновения кошки с новым, гетерологичным штаммом паразита (Zulpo, etal., 2018).

Бесполый, или тканевой, цикл развития Toxoplasmagondii является общим для всех теплокровных животных, в том числе и для представителей семейства кошачьих. После заглатывания животным токсоплазмы внедряются в клетки эпителия кишечника, где преобразуются в тахизоиты, обладающие способностью к быстрому делению. В случае недостаточно сильного иммунного ответа, тахизоиты преодолевают эпителиальный барьер кишечника и разносятся кровеносной системой, колонизируя ядерные клетки по всему организму хозяина. После проникновения внутрь клетки животного, тахизоит образует псевдоцисту, где продолжает интенсивно делиться до полного разрушения инвазированной клетки, после чего тахизоиты распространяются дальше. По мере формирования у животного активной иммунной защиты, токсоплазмы дифференцируются в медленнорастущие брадизоиты, которые образуют оболочку тканевой цисты, под защитой которой паразит может персистировать практически всю жизнь промежуточного хозяина. Преимущественное место локализации брадизоитов – мышечная и нервная ткань.

Учитывая вероятность развития у кошки токсоплазмоза как кишечной, так и тканевой формы, интерпретация результатов лабо-

раторных исследований имеет целый ряд сложностей. У естественно инфицированных кошек токсоплазмоз обычно протекает бессимптомно, клинически проявляясь при ретровирусных инфекциях (FIV, FeLV) и других иммунодефицитных состояниях. Поэтому основными методами выявления больных животных семейства кошачьих являются серологические и копрологические исследования. При первичном контакте организма с токсоплазмой не ранее чем через 10дней начинается выработка антител класса М и через 14 дней начинается синтез антител IgG (Yin, etal., 2015). Через несколько недель синтез антител IgM прекращается, но при дальнейшем контакте организма с антигенами токсоплазмы происходит селективный отбор клонов В-клеток, в результате которого начинают синтезироваться антитела IgG с высокой авидностью. Это свойство иммунной системы с успехом используется в медицинской практике для определения срока заражения и наличия рисков для протекающей беременности. Однако в ветеринарной практике методы определения типа антител и их титра не позволяют дать достоверное заключение об инфекционной опасности кошки для окружающих. Начало активной выработки специфических антител, как правило, обуславливает и, соответственно, совпадает с моментом, когда у кошки происходит прерывание дальнейшей экскрециооцист. Наиболее часто определяемый показатель титров антител IgG позволяет сделать только заключение, что перенесенный токсоплазмоз был недавно перенесенным или наблюдается хроническая форма инфекции. Причем, высокие концентрации IgG могут поддерживаться без повторных циклов заражений благодаря наличию у кошки тканевых цист, обеспечивающих непрерывное поступление антигенов и регулярную инициацию клеток иммунной памяти. Копрологические исследования на выявление непосредственно ооцист токсоплазмы, проводятся чаще всего с использованием высокочувствительных и специфичных методов на

основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако эти методики имеют тоже ряд ограничений, т.к. высокая чувствительность ПЦР позволяет обнаруживать ДНК Toxoplasmagondii, полученную с брадизоидами в зараженной добыче даже при отсутствии формирования ооцист. (Marie-Lazarine Poulle, 2016)

Результаты собственных исследований. Для определения показателей превалентости токсоплазмоза в популяции городских кошек домашнего содержания были исследованы сыворотки животных для определения титров специфических IgG методом ИФА. Параллельно, для определения наличия ооцист в фекалиях животных, были проведены исследования по выявлению ДНК Toxoplasmagondii методом ПЦР.

Для исследования были использованы биологические образцы, полученные от кошек с разных районов московского мегаполиса в период 2015 – 2017 гг.

Полученные результаты определения титров специфических IgG, были разбиты на четыре группы:

- отрицательный результат (титр Ig G менее 0,2 МЕ/мл); группа животных, у которых наиболее вероятно отсутствовал контакт с токсоплазмой
- низкий (сомнительный) уровень титров IgG (0,2-0,79 МЕ/мл); группа животных, у которых контакт с токсоплазмой, возможно, был, но давно
- средний уровень титров IgG (0,8-2,99 МЕ/мл); группа животных, которые были инфицированы токсоплазмой относительно недавно
- высокий уровень титров IgG (3,0МЕ/мл и выше), группа животных, которые недавно перенесли заболевание или животные больные в активной стадии, возможно с циркуляцией тахизоитов.

Таблица 1. *Процент выявляемости животных, серопозитивных к* Toxoplasmagondii.

Уровень титров IgG,	2015		2016		2017	
Высокий	28	6,83%	7	2%	3	0,99%
Средний	52	12,68%	55	16,72%	35	11,51%
Всего исследований	410	100%	329	100%	304	100%

Проведенное исследование, охватившее 1043 кошки из 39 муниципальных районов г. Москвы, показало, что в среднем ежегодно выявляется около 17 % городских кошек, у которых в ИФА титры специфических антител к Toxoplasmagondii выше 0,8 МЕ/мл. Согласно инструкции производителя диагностических наборов, данный уровень титров антител соответствует положительной реакции на токсоплазмоз. Учитывая, что у большого числа городских кошек домашнего содержания происходит чередование периодов свободного выгула с полной изоляцией, в течение которой контакт с токсоплазмой отсутствует и происходит значительное падение титров специфических антител, то реальное число животных, перенесших инвазию хотя бы один раз в течении своей жизни, можно прогнозировать на значительно большем уровне.

Территориальное распределение мест выявления серопозитивных животных имело диффузный характер и находилось в прямой зависимости от общего количества поступивших проб с каждого определенного района (рис.1).

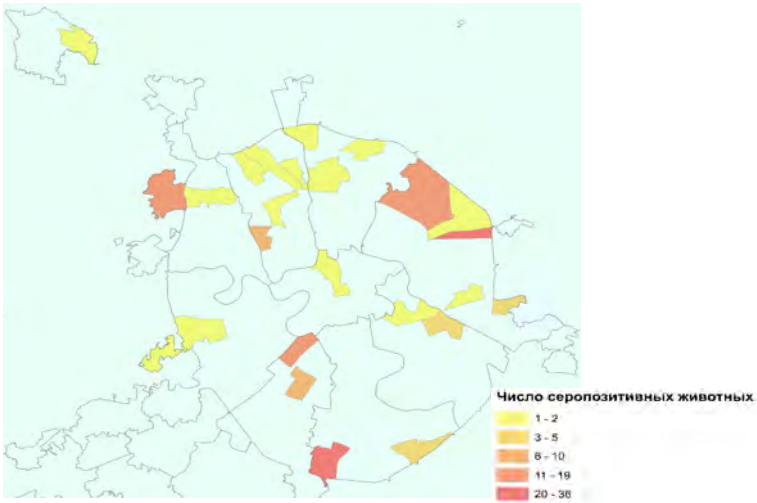


Рис.1 Территориальное распределение выявления серопозитивных по токсоплазмозу кошек в Москве в 2015-2017 гг.

Для выявления случаев экскреции ооцист токсоплазм с фекалиями былиспользован метод ПЦР в реальном времени. В 2015 году было исследовано 892 проб кала, в 2016 - 725 проб, в 2017- 1014 проб. Выделение нуклеиновыхкислот проводилосьнаборами на магнитных частицах с силикатной оболочкой. Образцы фекалий перед исследованием стандартизировали, делая 5% суспензию образца в стерильном физрастворе. Смывы со слизистой оболочки кишечника дополнительной подготовке не подвергали.

Все исследованные образцы за 2015-2017 гг. (2631 проба) не содержали ДНК Toxoplasmagondii. У 40 животных, имеющих высокий, средний и сомнительный уровень титров специфических антител, симультанное исследование калана токсоплазмоз методом ПЦР было отрицательно.

Заключение. Превалентность токсоплазмоза в популяции кошек московского мегаполиса составляет около17 %, но этот показатель подвержен колебаниям и за последние три года менялся в границах от 12,5 до 18,5 %. В условиях мегаполисазаражение кошек токсоплазмозом возможно при кормлении сырыми мясопродуктами, но наиболее часто инфицирование происходит во время охоты на грызунов при вывозе животных на дачные участки. После заражения токсоплазмами кошки непродолжительное время выделяют ооцисты, но это происходит несколько дней после заражения, когда животное еще находится за городом. Далее кошки становятся на несколько месяцев не восприимчивы к повторному заражению и поэтому, когда животных возвращают в город, их фекалии не содержат паразита и в большинстве случаев не представляют реальной угрозы для окружающих. Данное предположение подтверждается настоящим исследованием, показавшим, что инцидентность выделения ооцист с фекалиями городских кошек крайне низкая.

Для минимизации эпидемиологических рисков можно придерживаться стандартных рекомендаций о своевременной уборке кошачьих туалетов, не допуская споруляции ооцист и исключении из рациона кошек сырого мяса для предотвращения поедания тканевых цист токсоплазмы.

Работа проводилась в рамках выполнения государственного задания по программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук по теме № 0578-2014-0011.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

Christopher A. Hunter L. David Sibley Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors [Журнал] // Nat Rev Microbiol.. - Nov 2012 г.. - стр. 766–778.

Dubey J P Toxoplasmosis of animals and humans [Статья]. - [б.м.] : CRC Press, 2010 г..

Kärt Must Marjo K. Hytönen, Toomas Orro, Hannes Lohi, Pikka Jokelainen Toxoplasma gondii seroprevalence varies by cat breed [Журнал] // PLoS One. . - 2017 г.

Marie-Lazarine Poulle 1,2,aMarie-Amélie Forin-Wiart, Émilie Josse-Dupuis, Isabelle Villena, and Dominique Aubert Detection of Toxoplasma gondii DNA by qPCR in the feces of a cat that recently ingested infected prey does not necessarily imply oocyst shedding [Журнал] // Parasite. - 2016 г.. - Т. 23. - стр. 4.

Müller UB Howard JC The impact of Toxoplasma gondii on the mammalian genome [Журнал] // Current opinion in microbiology. - 2016 г..

Ricardo T. Gazzinelli Rondon Mendonça-Neto, Jingtao Lilue, Jonathan Howard, Alan Sher Innate resistance against Toxoplasma gondii: An evolutionary tale of mice, cats and men [Журнал] // Cell Host Microbe. - Feb 2014 г.. - стр. 132–138.

Veronesi F Santoro A, Milardi GL, Diaferia M, Morganti G, Ranucci D, Gabrielli S. Detection of Toxoplasma gondii in faeces of privately owned cats using two PCR assays targeting the B1 gene and the 529-bp repetitive element. [Статья] // Parasitol Res. - 2017 г.. - 3 : Т. 116. - стр. 1063-1069.

Zulpo D L [идр.] Toxoplasma gondii: A study of oocyst re-shedding in domestic cats. [Журнал] // Vet Parasitol. - 2018 г.. - Т. 249.

Васильев В. В. Токсоплазмоз: руководство по инфекционным [Книга] / ред. Ю.В. Лобзин. - Санкт-Петербург : [б.н.], 2003. - стр. 661-672.

Ермакова Н. А. ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА [Журнал]. - Казань : Общество с ограниченной ответственностью "Практика", 2012 г.. - стр. 51-56.

УДК 619:619.98:578.56

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА АЧС С ДЕЛЕЦИЯМИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

Шкаликова М.В., м.н.с. лаборатории Молекулярной вирусологии ФГБНУ ФИЦВиМ, E-mail: masha67111@mail.ru

Кольцова Г.С., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Молекулярной вирусологии ФГБНУ ФИЦВиМ, E-mail:Lila5757@yandex.ru

Титов И.А., кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории Молекулярной вирусологии ФГБНУ ФИЦВиМ, E-mail: titoffia@yandex.ru

Малоголовкин А.С., кандидат биологических наук, зав. Лабораторией Молекулярной вирусологии ФГБНУ ФИЦВиМ, E-mail: Malogolovkin@inbox.ru

ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”. 601125, пгт. Вольгинский, Владимирская область, Россия, Тел./факс: (4922) 37-92-51; 37-92-61.

Аннотация. Африканская чума свиней (АЧС) является острым вирусным заболеванием, которое приводит к высокой смертности у домашних свиней. АЧС приводит к значительным экономическим потерям, которые неизбежны в отсутствие эффективной вакцины, а доступными методами борьбы с болезнями являются карантин и убой зараженных животных. Диагностика должна основываться на быстром выявлении заболевания в полевых условиях, что имеет большое значение для борьбы с этим заболеванием.

Несмотря на почти столетнюю историю изучения вируса АЧС, многие фундаментальные вопросы биологии возбудителя остаются до конца не изученными. Вирус АЧС обладает исключительным потенциалом для уклонения от иммунной системы организма. Данная работа посвящена созданию генетических конструкций для получения рекомбинантных штаммов вируса АЧС с делециями иммуномодулирующих генов A238L, I329L и A224L.

В результате последовательного клонирования получены три рекомбинатные плазмиды. Первая и вторая рекомбинатные плазмиды созданы для делеции генов A238L и I329L с содержанием фрагментов генома штамма Волгоград/14с вируса АЧС. В состав третьей плазмиды для делеции гена A224L входили гены MGF505 10R, A240L, A104L штамма КК-262 вируса АЧС. В качестве селективного маркера использован – зеленый флюоресцентый белок (eGFP). Полученные генетические конструкции на основе плазмидных векторов в дальнейшем будут использованы для получения рекомбинантных вирусов с удаленными генами для лучшего понимания ключевых аспектов биологии вируса АЧС и разработки стратегий вмешательства против этого заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект 17-29-08010.

Ключевые слова: африканская чума свиней, клонирование, иммуномодулирующие белки, плазмидный вектор, зеленый флуоресцентный белок (EGFP).

GENETIC CONSTRUCTIONS FOR OBTAINING AFRICAN SWINE FEVER VIRUSRECOMBINANT VIRUSES WITH GENE DELETIONS CODING IMMUNOMODULATORY PROTEINS

Shkalikova M.V., Koltsova G.S., Titov I.A., Malogolovkin A.S.
Federal Research Center for Virology and Microbiology

601125, Volginsky, Vladimir Region, Russia, Tel./Fax: (4922) 37-92-51.

Summary. African swine fever (ASF) is an acute viral disease that leads to high mortality in domestic pigs.ASF leads to significant economic losses that are unavoidable in the absence of an effective vaccine, and quarantine and slaughter of infected animals are available methods of fighting diseases. Diagnosis should be based on the rapid detection of the disease in the field, which is of great importance for fighting this disease. Despite the almost 100-year history of the ASF virus study, many of the fundamental questions of the pathogen biology remain unclear. The ASF virus has an exceptional potential for evading the body's immune system. This work is devoted to the creation of genetic structures for the production of recombinant strains of the ASF virus with deletions of the immunomodulatory genes A238L, I329L and A224L.

As a result of consecutive cloning, three recombinant plasmids were obtained. The first and second recombinant plasmids were created for the deletion of the A238L and I329L genes with the content of fragments of the Volgograd/14c ASF virus strain genome. The third plasmid for the A224L gene deletion included the MGF505 10R, A240L, A104L genes KK-262 ASF virus strain. A green fluorescent protein (eGFP) is used as a selective marker. The resulting genetic constructs based on plasmid vectors will subsequently be used to produce recombinant viruses with deleted genes to better understand the key aspects of the ASF virus biology and to develop intervention strategies against this disease.

The work was supported by the RFBR project 17-29-08010.

Key words: African swine fever, cloning, immunomodulatory proteins, plasmid vector, green fluorescent protein (EGFP).

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) является опасной и контагиозной болезнью домашних свиней и диких кабанов, что на

сегодняшний день представляет серьезную угрозу для развития свиноводческой отрасли по всему миру.

Вирус АЧС оставался энзоотичным в Африке в течение многих десятилетий во время сильватического цикла передачи между домашними свиньями и природными резервуарами вируса, африканскими дикими свиньями и клещами рода *Ornithodoros*, в которых вирус может воспроизводиться без видимых клинических признаков [8].

Неконтролируемое присутствие вируса АЧС способствовало его периодическому вывозу в другие страны. В 2007 году вирус прибыл в Республику Грузию из Восточной Африки в качестве пищевого загрязнителя [3]. С тех пор вирус АЧС распространился по всему Кавказскому региону и на соседние страны, включая Российскую Федерацию [2].

Отсутствие доступных вакцин против вируса АЧС доставляет определенные трудности в контроле заболевания. До настоящего времени только живые аттенуированные вирусы продемонстрировали прочную защиту от гомологичных штаммов, но они не смогли вызвать надежный кросс-защитный иммунитет против гетерологичных вирусов [7].

Наличие нескольких генов вируса АЧС, вовлеченных в иммунное уклонение от хозяина подтверждает актуальность врожденной иммунной системы в защите [4]. К таким генам относятся, например, A238L (белок 5el) - IkB гомолог и ингибитор кальций нейрин фосфатазы, вызывающий запрограммированную гибель клетки и I329L (белок k11l) - ингибитор сигнальных путей Toll-подобных рецепторов [1, 6].

Апоптоз представляет собой важный механизм врожденного иммунного ответа для предотвращения вирусной инфекции. Однако многие вирусы разработали стратегии ингибирования или задержки этого клеточного ответа. Одним из таких факторов является ген

A224L вируса АЧС, который кодирует белок-аналог ингибитора апоптоза (IAP). Вирусный белок A224L взаимодействует с протеолитическим фрагментом каспазы-3 и ингибирует активность протеазы при вирусной инфекции. Кроме того, было отмечено, что данный вирусный белок активирует NF-κB [5].

Создание рекомбинантных вирусов, полученных путем замены или удаления различных генов, поспособствует лучшему пониманию многих аспектов жизненного цикла вируса и разоблачению функций белков вируса АЧС *in vitro*.

Целью работы являлось создание генетических конструкций для получения рекомбинантных штаммов вируса АЧС с делециями генов A238L, I329L и A224L.

Материал и методика исследований. В работе использовали аттенуированный штамм КК-262 (I генотип, 2 сероиммунотип) и вирулентный штамм Волгоград/14с (II генотип, 8 сероиммунотип) вируса АЧС, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ. Расчет праймеров проводился с помощью программы Oligo 6.0. и веб-сервера IDT DNA (https://eu.idtdna.com/site) с учетом наличия сайтов рестрикции в составе вектора pGEM-TEasy и с соблюдением открытой рамки считывания (ОРФ).

Для выделения ДНК из вируссодержащей культуральной жидкости применялся набор «ДНК-сорб-В» («Амплисенс», Россия). Оптимизация температурных режимов ПЦР проводилась на термоциклере T100 («Bio-Rad Laboratories», США). Анализ продуктов реакции осуществлялся при помощи электрофореза в 1,5 % агарозном геле, и учитывался на Chemi Doc MP («Bio-RadLaboratories», США).

Для дальнейшего клонирования ПЦР продукты были получены с использованием набора Phusion® High-Fidelity PCR Kit («New

England Biolabs», США). Рестрикцию проводили набором Fast Digest Value Pack («Thermo Fisher Scientific», Германия). Для лигирования ПЦР-продуктов с вектором pGEM®-T Easy («Promega», США) использовали T4 DNA Ligase («New England Biolabs», США) с последующей трансформацией бактериальной культуры *E.coli XL1-Blue* (Евроген, Россия). Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи набора ISOLATEII Plasmid Mini Kit («Bioline», США). Для подтверждения наличия вставок и их ориентации в плазмидах использовали ПЦР со специфическими праймерами и рестрикцию с использованием эндонуклеаз рестрикции (BamHI, ApaI, SacII, SacI, SalI и PstI).

Результаты исследований. На первом этапе работы определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов MGF360-15R, A859L, I243L, I73R, I215L и межгенных регионов между данными участками штамма Волгоград/14с штамма вируса АЧС. На следующем этапе нашей работы были подобраны олигонуклеотидные праймеры со специфическими гексамерными последовательностями сайтов рестрикции эндонуклеаз для амплификации плечей рекомбинации и гена GFP с целью дальнейшего их клонирования в плазмидный вектор. Плечи рекомбинации представляли собой фрагменты генома вируса АЧС длинной 700-1000 п.о., расположенные слева и справа от генов A238L, I329L и A224L.Ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок EGFP, под контролем промотера гена B646L вируса АЧС был использован в качестве репортерногогена во всех трех конструкциях для дальнейшего скрининга рекомбинантных клонов. В ходе выполнения работ были оптимизированы условия проведения ПЦР для амплификации данных продуктов.

В результате последовательного клонирования получены три рекомбинатные плазмиды на основе вектора pGEM®-T Easy vector. Первая рекомбинатная плазмида для делеции гена A238L содержит в

себе фрагмент нуклеотидной последовательности гена MGF360-15R, A859L с участками межгенных регионов и ген EGFP. Вторая плазмида для делеции гена I329L содержит фрагменты генов I243L, I73R, I215L, межгенных регионови ген EGFP. Данные плазмиды содержали фрагменты генома штамма Волгоград/14свируса АЧС и в дальнейшем будут использованы для получения рекомбинантных вирусов на его основе. Гены MGF505 10R, A240L, A104L штамма КК-262 вируса АЧС и ген EGFP входили в состав третьей плазмиды для делеции гена A224L.

Отсутствие нуклеотидных замен в рекомбинантных плазмидах подтверждали нуклеотидным секвенированием.

Заключение. Полученные генетические конструкции на основе плазмидных векторов будут использоваться для гомологичной рекомбинации с целью получения рекомбинантных вирусов АЧС с удаленными иммуномодуляторными генами.

Использование рекомбинантных вирусов с удаленными или измененными генами позволит лучше понять ключевые аспекты биологии вируса АЧС и открыть новые возможности для получения безопасной и эффективной вакцины.

Работа выполнена в рамках государственного задания 0615-2017-0001 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08010.

Литература

A novel TLR3 inhibitor encoded by African swine fever virus (ASFV) / V.L. De Oliveira, S.C. Almeida, H.R. Soareset al. // Arch. Virol. -2011. - Vol. 156. - P. 597-609.

African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012 / A. Gogin, V. Gerasimov, A. Malogolovkin et al. // Virus Res. - 2013. - Vol. 173. - P. 198-203.

African swine fever virus isolate, Georgia, 2007 / R.J. Rowlands, V. Michaud, L. Heath et al. // Emerg. Infect. Dis. - 2008. - Vol. 14. - P. 1870-1874.

Correia, S. Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV / S. Correia, S. Ventura, R.M. Parkhouse // Virus Res. - 2013. - Vol. 173. - P. 87-100.

Galindo, I. African Swine Fever Virus: A Review / I. Galindo, C. Alonso // Viruses. - 2017. - Vol. 9. -P. 103.
Granja, A.G. A238L inhibits NF-ATc2, NF-kappa B, and c-Jun activation through a novel mechanism involving protein kinase C-theta-mediated up-regulation of the amino-terminal transactivation domain of p300 / A.G. Granja, N.D. Perkins, Y. Revilla // J. Immunol. - 2008. - Vol. 180. - P. 2429-2442.
Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization / K. King, D. Chapman, J.M. Argilaguet et al. // Vaccine. - 2011. - Vol. 29. - P. 4593-4600.
Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian Ocean / F. Jori, L. Vial, M.L. Penrithet al. // Virus Res. – 2013. - Vol. 173. - P. 212-227.

УДК 619:615.371:578.835.2/1

РАЗРАБОТКА ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЛАБОРАТОРИИ ВИРУСОЛОГИИ ВИЭВ

Шуляк А.Ф., кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник

Юров К.П., доктор ветеринарных наук, профессор

ФГБНУ ФНЦ «ВИЭВ РАН», Москва, Рязанский пр., 24, к.1

Аттенуция вирусов-возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота, разработка вакцин, внедрение их в производство и ветеринарную практику являлись в последние десятилетия 20-начало 21-го века одним из приоритетных направлений работы лаборатории вирусологии ВИЭВ. В результате была создана линейка безопасных вакцин против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 с высокой противоэпизоотической эффективностью, конструкция и тактика применения которых соответствует особенностям эпизоотического процесса и технологии выращивания крупного рогатого скота в нашей стране.

Ключевые слова: инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек, парагрипп-3,вирус, штамм, аттенуация, вакцина

DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST BOVINE VIRAL RESPIRATORY DISEASES IN VIEV'S LABORATORY OF VIROLOGY

Shuliak A.F., Yurov K.P.

Key words: infectious bovine rhinotracheitis, viral diarchea-mucosal disease, parainfluenza-3, virus, strain, attenuation, vaccine

Технологические изменения в животноводческой отрасли СССР во второй половине 20-го столетия сопровождались массовым завозом животных из разных стран. Вместе с ними появились болезни, ранее не имевшие значения для нашей страны. Некоторые из них быстро распространились и приобрели стационарный характер. Сотрудники лаборатории вирусологии ВИЭВ первыми в СССР изолировали вирусы инфекционного ринотрахеита (ИРТ, BHV 1), вирусной диареи-болезни-слизистых оболочек (ВД-БС, PV 1), парагриппа-3 (ПГ-3). Доказали этиологическую роль этих вирусов в возникновении вспышек респираторных болезней крупного рогатого скота (КРС) и создали коллекцию штаммов возбудителей.

Исследования, проведенные в разных странах в 60-е гг., показали эффективность вакцин против ИРТ, ВД-БС и ПГ-3. Два фактора – распространение данных инфекций и отсутствие отечественных профилактических препаратов – инициировали исследования по разработке вакцин, параллельно живых и инактивированных. Инактивированные вакцины представляют собой более быстро конструируемый продукт, но они стимулировали сравнительно слабую иммунную реакцию у естественно восприимчивых животных, как в экспериментальных, так и производственных условиях. Включение в состав препарата разных штаммов, адъювантов, иммуномодуляторов и пр., не приводило к значительному повышению иммуногенности, что связано с биологической особенностью данных возбудителей – их низкой антигенной активностью. Результаты исследований убедительно показали, что инактивированные вакцины против ИРТ, ВД-БС и ПГ-3 могут использоваться, в основном, в благополучных хозяйствах как средство снижения риска экзогенного инфицирования поголовья.

Основные усилия сотрудников лаборатории были направлены на получение модифицированных штаммов и изучение их на разных этапах аттенуации (1; 2; 3). Многолетние фундаментальные исследования с применением самых современных на тот период методов, сотен экспериментальных животных и тысяч – в производственных условиях привели к получению аттенуированных штаммов вирусов ИРТ (ТК-А), ВД-БС (ВК-1В1), ПГ-3 (ПТК 45/86). Методы ослабления вирулентности каждого из вирусов имели определенные отличия, но в обобщенном виде включали пассирование в гомологичных и гетерологичных культурах клеток, культивирование при различных температурах, облучение УФЛ, селекцию. Полученные модифицированные штаммы обладают свойствами, которые позволяют считать их вакцинными, а выпуск препаратов из них – эффективным и технологичным. Они не представляют опасности для людей, животных и окружающей среды. Исследования, проведенные на естественно восприимчивых животных, показали, что модифицированные штаммы в течение 7-12 дней элиминируют из организма привитого КРС и при контакте не передаются или ограниченно передаются от привитых животных непривитым. Индуцируют напряженный иммунитет, обусловленный синтезом интерферона (5), реакцией Т- и В-лимфоцитов, формированием специфических антител классов А, М и G. Штамм ТК-А стимулирует формирование иммунитета как к BHV-1, так и к BHV-5. Штамм ВК-1В1 вируса ВД-БС относится к типу 1, доминирующему в Европе (в России более 80% изолятов относятся к этому типу). Модифицированные штаммы характеризуются стабильностью аттенуации (4), и за 40-летний период наблюдений не отмечено случаев реверсии вирулентности. При длительном пассировании в культурах клеток уровень репродукции и антигенная активность вирусов не снижалась. Наиболее иммуногенные пулы с оптимальной концентрацией вируса получают в первичной культуре

клеток почек серонегативных телят. Аттенуированные вирусы сохраняют жизнеспособность при лиофилизации и продолжительном хранении. При оптимизации режима сушки потери инфекционной активности не превышали 0,5 lg. Хранение лиофильно высушенных в ампулах и флаконах вирусов при температуре 4^0С течение 23 месяцев (срок наблюдения) не приводило к снижению инфекционного титра; вирусы, хранившиеся в аналогичных условиях более 25 лет, также оказались жизнеспособными.

Полученные штаммы послужили основой для конструирования и производства линейки моно- и ассоциированных вакцин. Первым коммерческим препаратом в этом ряду была вирусвакцина ТК-А (ВИЭВ) В-2 против ИРТ (1978). Максимальный объем производства этой вакцины достигал 11,5 млн. доз в год. В связи с высоким уровнем серопревалентности ПГ-3 у КРС в конце 70-х-начале 80-х гг. был осуществлен цикл экспериментальных работ по созданию ассоциированной вакцины против ИРТ и ПГ-3 на основе штаммов ТК-А и ПТК 45/86, завершившийся внедрением вакцины в производство. Выпуск вирусвакцины против ВД-БС был начат в конце 80-х гг. Несмотря на высокую иммуногенность и безвредность препарата, спрос на него был сравнительно невысоким. Это объясняется недооценкой значимости возбудителя в инфекционной патологии, неполными знаниями его биологии, эпизоотического процесса, состоянием диагностики этой инфекции на тот период.

В 90-е гг. усилилась тенденция по созданию и применению поливалентных вакцин, способных стимулировать иммунитет одновременно против нескольких инфекций в максимально короткие сроки.

Результаты мониторинга свидетельствовали о том, что в 80-90-е гг. в нашей стране ИРТ и ВД-БС были распространенными и экономически значимыми вирусными инфекциями КРС, протекающими с респираторным синдромом, транзитным нарушением репро-

дуктивных функций, абортами, рождением нежизнеспособного потомства. «Слабые» звенья эпизоотической цепи этих инфекций совпадают: это осеменение, беременность, постнатальный период, формирование стада молодняка, цикличность, тенденция к стационарности. Вирусы ИРТ и ВД-БС нередко циркулируют в популяции одновременно и в ряде случаев вызывают заболевание смешанной этиологии. ПГ-3 – убиквитарная инфекция, характеризующаяся самым высоким уровнем серопревалентности, хотя подтвердить ведущую роль вируса ПГ-3 при вспышках респираторной болезни удается не часто.

Учитывая вышеизложенные обстоятельства, были проведены исследования для оценки возможности и условий объединения трех ранее полученных аттенуированных штаммов в одном препарате (6). В опытах на серонегативных телятах испытывали лабораторные серии вакцины с различным содержанием вирусов. Результаты учитывали по клинической реакции животных на прививку, динамике поствакцинальных антител, устойчивости к контрольному заражению. При внутрикожном (6), подкожном и интраназальном введении оптимальная иммунизирующая доза составила 5 lg вируса ИРТ, 4,5 – ВД-БС, 5,5 – ПГ-3, что в 5 раз превышает дозы соответствующих моновакцин. Динамика и уровень вируснейтрализующих антител были сопоставимыми с индуцированными моновакцинами (в среднем 1 : 16-1 : 32 против ИРТ и ВД-БС и 1 : 64-1 : 128 против ПГ-3). Поствакцинальная клиническая реакция на 1, 2, 10 доз препарата наблюдалась у отдельных животных и была минимальной. Превентивная доза вакцины для взрослых животных была в два раза выше дозы для молодняка.

Результаты испытания в различных географических, экономических, технологических, эпизоотологических условиях показали противоэпизоотическую эффективность трехвалентной вакцины.

Телята в возрасте 13-15 дней в 20% случаев реагировали на вакцинацию небольшим подъемом температуры, слезотечением, в возрасте 28-30 дней клиническая реакция, в основном, отсутствовала. Вакцина не вызывала инволюции плода при введении в первые месяцы беременности и абортов в последнем триместре беременности. Она включала иммунные механизмы различного уровня. Штамм вируса ИРТ стимулировал продукцию альфа-рН-лабильного интерферона (альфа-интерферон с примесью гамма-интерферона), штамм вируса ВД-БС – синтез альфа-интерферона клетками эндотелия кровеносных сосудов, а оба вируса – синтез цитокинов эндотелиальными клетками. Эти реакции врожденного иммунитета обеспечивали устойчивость телят к заражению уже через сутки после иммунизации и в течение последующих 3-5-ти дней. С 14-го дня устойчивость животных к заражению нарастала за счет клеточного, секреторного и гуморального иммунитета. Двукратная вакцинация вызывала повышение титра антител как у серонегативных, так и серопозитивных животных различного возраста.

Применение вакцины, получившей коммерческое название «Вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареиболезни слизистых оболочек и парагриппа-3 поливалентная сухая «Тривак», способствовало снижению инцидентности респираторного синдрома на 27-75%, смертности – на 16-51%. В стадах с перманентными проблемами воспроизводства, связанными с вирусами ИРТ и ВД-БС, применение вакцины приводило к постепенной нормализации: за 2-3 года оплодотворяемость повышалась на 7-10%, снижались продолжительность сервис-периода, число абортов, мертворождений, на 40% увеличивался выход телят.

В период широких производственных испытаний препарата регистрировали все случаи неудовлетворительных результатов вакцинации, основными причинами которых были ошибочный диагноз,

«запаздывание» в проведении прививок, одновременное применение с другими, особенно многокомпонентными препаратами, широкое распространение вирусоносительства в стаде, иммунизация инкубатиков, иммунодефициты, глубокие изменения минерального и белкового метаболизма.

Параллельно с аттенуацией штаммов разрабатывалась технология производства и контроля вакцин. В настоящее время этот процесс выглядит следующим образом. Репродукция вирусов осуществляется в первичной культуре клеток почек серонегативных телят в возрасте до 1 месяца, свободных от контаминации вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами. Попытки, следуя мировому тренду, перевести производство вакцин на постоянные линии клеток, не дали положительного результата из-за снижения иммуногенности вакцин, проблемы контаминации культур нецитопатогенными вирусами, удорожания производства.

Культуру клеток инфицируют каждым вирусом отдельно. Культивирование прекращают после максимального поражения клеток, хранят до лиофилизации при постоянной пониженной температуре.

Для получения пулов вакцинных штаммов с максимально высокой активностью клетки выращивали в роллерах, на микроносителях и пр. Однако, это оказалось нецелесообразным, т.к. значительное разведение готового препарата приводило к снижению его иммуногенности. До настоящего времени применяется стационарное культивирование, что дает оптимальное накопление вирусов.

На разных стадиях производственного процесса осуществляются контрольные исследования. К ним относятся периодическое электронно-микроскопическое, молекулярно-генетическое и иммунологическое тестирование производственных штаммов. Проводится контроль сыворотки крови телят-доноров и сыворотки для культиви-

рования клеток на отсутствие специфических антител; контроль трипсина, сыворотки крови, среды для культивирования, клеточной суспензии, вирусного сырья, лиофилизированного полуфабриката на различные виды контаминации, включающие бактериологические, молекулярно-генетические. иммунологические методы. Активность вирусов определяют титрованием в культуре клеток, безвредность и иммуногенность вакцин – на серонегативных телятах в возрасте 2-3 месяца.

Заключение. Сотрудниками лаборатории вирусологии ВИЭВ были получены нереверсибельные аттенуированные штаммы вирусов ИРТ, ВД-БС, ПГ-3, на основе которых разработана линейка вирусвакцин с высокой противоэпизоотической эффективностью. Конструкция вакцин и тактика их применения строго соответствуют особенностям эпизоотического процесса при вирусных инфекциях, вызывающих респираторно-репродуктивную патологию, а также технологии выращивания КРС в нашей стране. Разработанные поливалентные препараты не перегружены антигенами, в том числе и теми, которые должны прививаться в другие сроки. Это позволяет снизить конкурентное взаимодействие компонентов и обеспечить удовлетворительный уровень иммунного ответа.

Литература

1) Белкина Н.М. Изучение некоторых биологических свойств вирусов группы герпес. Канд. дисс. М. 1974.

2) Вечеркин А.С. Вирусвакцина против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3: реактогенные, иммуногенные свойства и способ применения. Канд. дисс. М. 1982.

3) Жидков С.А. Вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (характеристика возбудителя, диагностика и специфическая профилактика). Докт. дисс. М. 1994.

4) Зудилина З.Ф., Шуляк А.Ф., Ярных Е.В. Стабильность аттенуации парагриппозного штамма в отдельности и в ассоциации с вакцинным штаммом вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Бюлл. ВИЭВ. 1984. № 55. С. 35.

5) Орлова Т.Г., Щегловитова О.Н., Шуляк А.Ф., Крюков Н.Н. Кислотостабильный и кислотолабильный интерфероны, продуцируемые вирусом инфекционного ринотрахеита. Вопросы вирусологии. 1988. № 4. С. 437-440.
6) Щербаков П.Н. Инактивированная вакцина против инфекционногоринотрахеита телят: иммуногенные, реактогенные свойства и способ применения.Канд. дисс. М. 1993.
7) Юров К.П., Шуляк А.Ф., Глотов А.Г., Заерко В.И. Вакцина «Тривак» против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи-болезни слизистых оболочек и парагриппа-3 крупного рогатого скота. Ветеринария. 2015. № 12. С. 17-21.

Издано ООО "Агентство творческих технологий"
DOI Prefix 10.30917
Свидетельство о регистрации серия 77 № 006732779 от 15.10.2004 г.
Формат 60x90 $^{1}/_{8}$
Усл. печ. листов 45, Усл. изд. листов 47,2
Тираж 500 экз. Бумага офсетная.
Гарнитура «TimsNewRomanCyr». Печать с готового оригинал-макета ООО Принт-Ю. Подписано в печать 22.10.2018.
Заказ 8785