

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)

На правах рукописи

Якимова Эльвира Алексеевна

**Биологические свойства штаммов возбудителя риимереллёза
водоплавающих птиц, выделенных на территории
Российской Федерации**

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Капустин Андрей Владимирович

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	4
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1.	Риемереллёз водоплавающей птицы	11
2.1.1.	Современная таксономия <i>Riemerella anatipestifer</i>	12
2.1.2.	Свойства бактерий вида <i>Riemerella anatipestifer</i>	12
2.1.3.	Факторы вирулентности <i>Riemerella anatipestifer</i>	16
2.1.4.	Видовая восприимчивость	17
2.1.5.	Предрасполагающие к развитию заболевания факторы	18
2.1.6.	Пути передачи возбудителя	18
2.1.7.	Клинико-морфологическое проявление риемереллёза	19
2.2.	Лабораторная диагностика	20
2.3.	Лечебные мероприятия при риемереллёзе	21
2.4.	Специфическая профилактика риемереллёза	22
2.5.	Заключение	23
3.	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
3.1.	Материалы	25
3.2.	Методы	27
3.2.1.	Микробиологические	27
3.2.2.	Биотехнологические	28
3.2.3.	Клинические	29
3.2.4.	Патоморфологические	30
3.2.5.	Иммунобиологические	30
3.2.6.	Методы молекулярной биологии	30
3.2.7.	Метод масс-спектрометрии (MALDI-ToF)	31
3.2.8.	Статистическая обработка результатов	31
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	32
4.1.	Клинико-морфологическое проявление риемереллёза	32
4.2.	Результаты бактериологического исследования	39
4.3.	Разработка схемы лабораторной диагностики риемереллёза	43
4.4.	Эпизоотологические данные по риемереллёзу	49
4.5.	Характеристика изолятов <i>Riemerella anatipestifer</i>	51

4.6.	Антибиотикорезистентность штаммов <i>Riemerella anatipestifer</i>	55
4.7.	Патогенные и вирулентные свойства изолятов <i>Riemerella anatipestifer</i>	58
4.8.	Изучение антигенных свойств штаммов риимерелл	62
4.9.	Определение иммуногенных свойств <i>Riemerella anatipestifer</i>	68
4.10.	Депонирование производственного штамма <i>Riemerella anatipestifer</i>	69
4.11.	Клинические испытания экспериментальной серии вакцины против риимереллёза на птицеводческом предприятии	70
4.11.1	Определение безвредности препарата в рекомендованной дозе при однократном применении для родительского поголовья птицы	71
4.11.2.	Безвредность препарата в рекомендованной дозе при двукратном введении для родительского поголовья птицы	72
4.11.3.	Безвредность препарата в дозе, двукратно превышающей рекомендованную для родительского поголовья птицы	73
4.11.4.	Изучение влияния препарата на сохранность молодняка, полученного от вакцинированного родительского поголовья птицы	74
4.11.5.	Определение антигенной активности препарата при использовании его в рекомендованной дозе при двукратном введении	75
5.	ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	78
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
7.	ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	91
8.	РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	92
9.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	93
10.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95
11.	ПРИЛОЖЕНИЯ	107

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Инфекционные болезни птиц промышленных видов, для производителей и государства в целом, являются причиной существенных экономических потерь, складывающихся из недополучения продукции и финансовых затрат на проведение профилактических и лечебно-оздоровительных мероприятий [71, 88, 95]. Интенсивная технология производства приводит к одновременному содержанию большого количества птицы на ограниченной площади, что увеличивает вероятность возникновения и распространения инфекций [37, 45, 82]. Помимо этого, риск возникновения инфекционных заболеваний на птицеводческих предприятиях Российской Федерации стоит ассоциировать с импортом в страну племенного инкубационного яйца, не контролируемого по ряду заболеваний, а также с миграциями перелетных птиц, являющихся носителями различных патогенов. В качестве примера можно рассматривать относительно новое, ранее официально не выявляемое на отечественных предприятиях, заболевание – риимереллёз, возбудителем которого является бактерия семейства *Flavobacteriaceae*, рода *Riemerella*, вида *Riemerella anatispestifer*.

Борьба с риимереллёзом в практических условиях осложнена, поскольку ветеринарные специалисты не осведомлены о наличии и распространенности возбудителя, отсутствуют методические указания по диагностике болезни, а также в России нет зарегистрированных средств специфической профилактики.

Актуальность изучения риимереллёза в РФ связана с возрастающей популярностью потребления мяса водоплавающей птицы. Согласно данным некоммерческой организации «Российский птицеводческий союз», суммарное поголовье уток и гусей в России в 2018 году составило 30,17 млн. голов, из которых 21,16 млн. уток и 9,0 млн. гусей, что в общей структуре поголовья птицы в стране составляет 3,9% и 1,7% соответственно. Указанный объем поголовья водоплавающей птицы, хоть и меньше поголовья кур, но имеет важное значение в экономике страны.

Необходимость изучения риимереллэза, как угрожающего для отечественного птицеводства заболевания, подчеркивается ФГБУ «ВНИИЗЖ», сотрудниками которого выявлены и описаны случаи инфекции в крупнейших утководческих предприятиях Российской Федерации и Европы [4].

Настоящая работа направлена на изучение вопросов, касающихся риимереллэза, в том числе распространенности болезни, особенностей возбудителя, методики лабораторного диагностирования заболевания, принципов лечения и специфической профилактики.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что инфекция в ряде зарубежных стран (Китай, Тайланд, Великобритания и др.) контролируется достаточно активно, в Российской Федерации риимереллэз является новой инфекционной патологией, ранее официально в стране не зарегистрированной. Отечественные данные о заболевании отсутствуют. Тем не менее, случаи выявления возбудителя уже зафиксированы в Республике Беларусь и в некоторых странах СНГ [2]. Поэтому можно смело утверждать, что рассматриваемый возбудитель активно циркулирует и на территории РФ уже достаточно длительное время, но ввиду сложности диагностирования и отсутствия мониторинга за распространенностью болезни, нельзя оценить в полной мере ущерб, причиняемый инфекцией.

Таким образом можно утверждать, что в Российской Федерации проблема риимереллэза не разработана, отсутствуют данные по распространённости заболевания, не описаны особенности клинико-морфологического проявления заболевания, нет сведений о серотиповой принадлежности штаммов возбудителя риимереллэза, циркулирующих на территории РФ, не разработаны методические указания, регламентирующие последовательность лабораторной диагностики риимереллэза. Решение этих вопросов, в первую очередь разработка схемы корректной диагностики заболевания, позволит обеспечить функционирование системы лечебно-оздоровительных мероприятий в неблагополучных хозяйствах, а также получить штаммы возбудителя для создания отечественного средства специфической профилактики риимереллэза.

Цель работы: изучить распространенность риимереллёза в Российской Федерации и биологические свойства возбудителя инфекции *Riemerella anatipestifer*.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по риимереллёзу водоплавающей птицы на территории отдельных регионов Российской Федерации и выявить возбудитель болезни *R. anatipestifer*.
2. Изучить особенности клинико-морфологического проявления риимереллёза у водоплавающих птиц.
3. Изучить культуральные, морфологические, тинкториальные, биохимические и патогенные свойства *R. anatipestifer*.
4. Изучить чувствительность изолятов *R. anatipestifer* к антибактериальным препаратам.
5. Разработать схему бактериологической диагностики риимереллёза.
6. Изучить антигенные и иммуногенные свойства изолятов *R. anatipestifer* и обосновать возможность специфической профилактики риимереллёза водоплавающей птицы.

Научная новизна.

- впервые получены эпизоотические данные о встречаемости, распространенности и клинико-морфологических особенностях проявления риимереллёза водоплавающей птицы на территории Российской Федерации;
- впервые изучены культуральные, морфологические, тинкториальные, биохимические и патогенные свойства возбудителя риимереллёза, выявленного в Российской Федерации;
- впервые определена и депонирована в базе GenBank нуклеотидная последовательность 16S rRNA штамма *Riemerella anatipestifer*, выделенного на территории России - strain VIEV_MKB_Duck_689-VIEV.
- впервые изготовлена и апробирована экспериментальная отечественная вакцина против риимереллёза водоплавающих птиц и подтверждена возможность эффективной профилактики инфекции.

Теоретическая и практическая значимость.

- разработаны методические указания «Диагностика риимереллёза водоплавающей птицы», одобренные ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол НМК №1 от 29.01.2019, протокол Ученого совета №2 от 31.01.2019) и утвержденные РАН в установленном порядке;
- паспортизированы и депонированы в Всероссийской коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН 9 штаммов *Riemerella anatipestifer*;
- разработан стандарт организации СТО 00496165-0003-2018 «Производственные и контрольные штаммы *Riemerella anatipestifer*. Метод изготовления и контроля посевных материалов», утвержденный 30.08.2018 г. Ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН;
- разработан стандарт организации СТО 00496165-0004-2018 «Вакцина против риимереллёза водоплавающих птиц инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ»», утвержденный 30.08.2018 г. Ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН;
- разработана инструкция по ветеринарному применению инактивированной вакцины против риимереллёза водоплавающих птиц «РеймерДак-ВИЭВ».

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом научного исследования стало изучение инфекционной патологии водоплавающей птицы – риимереллёза. Объектами исследования выступали штаммы *R. anatipestifer*, изолированные в ходе проведения лабораторно-диагностических исследований, лабораторные животные, птицы естественно-восприимчивых видов. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

В работе были использованы эпизоотологические, бактериологические, серологические, иммунологические, клинические, патологоанатомические,

статистические методы исследований, методы биотехнологии, молекулярной диагностики и метод времяпролетного масс-спектрометрического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эпизоотические данные по встречаемости и распространенности риимереллёза водоплавающей птицы на территории отдельных регионов Российской Федерации;
2. Изучение особенностей клинико-морфологического проявления риимереллёза водоплавающей птицы в Российской Федерации;
3. Схема лабораторной диагностики риимереллёза;
4. Результаты изучения культуральных, морфологических, тинкториальных, биохимических, вирулентных свойств изолятов *R. anatipestifer*;
5. Результаты изучения чувствительности изолятов *R. anatipestifer* к антибактериальным препаратам;
6. Результаты изучения антигенных и иммуногенных свойств штаммов *R. anatipestifer*.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена статистической обработкой данных, актами комиссионных испытаний, утвержденными в установленном порядке. Основные результаты исследований доложены на научных конференциях: Юбилейной международной научно-практической конференции «Здоровье животных: Современные научные подходы, направления, тенденции», Москва, 22 ноября 2018 года, ФГБНУ «Федеральные научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»; Национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения», Москва, 06-07 февраля 2019 года, ФГБОУ ВО «Московская государственная

академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»; а также на межлабораторных заседаниях ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Актуальность работы и значимость полученных результатов отмечены МСХ Российской Федерации на Российской агропромышленной выставке «Золотая осень» 10-13 октября 2018 года, с вручением серебряной медали «За научную разработку вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы «Реймер-Дак ВИЭВ».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ: в журналах рекомендованных ВАК РФ – 4 статьи, в базах индексируемых Scopus – 3 статьи, в научно-практическом журнале – 1 статья, а также методические указания, утверждённые руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН В.В. Калашниковым 20.03.2019 года.

Личный вклад автора. Автору принадлежит непосредственное осуществление исследований по изучению и анализу эпизоотической обстановки по риимереллёзу водоплавающей птицы в различных регионах Российской Федерации. Автор принимал личное участие в индикации, идентификации и изучении биологических свойств изолятов *R. anatipestifer*, на основании чего разработаны методические указания по диагностике риимереллёза водоплавающей птицы. Автором, совместно с сотрудниками лаборатории микробиологии с музеем типовых культур, была проведена паспортизация и депонирование эпизоотических штаммов *R. anatipestifer* в Всероссийской коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и международной базе GenBank, а также отработана технология получения протективных антигенов возбудителя, создана и апробирована экспериментальная вакцина против риимереллёза птиц.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 118 листах компьютерного текста и включают: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, заключение с выводами, сведения о практическом использовании результатов исследований, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы (108 источников, в т.ч. 102 – иностранных работ). Диссертационная работа содержит 8 таблиц, 15 рисунков, приложения на 11 листах.

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.в.н. Капустину А.В., к.б.н. Лаишевцеву А.И., к.в.н., доценту Илиешу В.Д. и заведующему лабораторией микробиологии с музеем типовых культур, к.в.н. Горбатову А.В. за оказание практической и консультационно-методической помощи.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Риимереллёз водоплавающей птицы

Риимереллёз («инфекционный серозит», «новое заболевание уток», «септицемия уток», «инфлюэнция гусей», «экссудативная септицемия гусей») - заразная болезнь уток, гусей, индеек и других видов домашней и дикой птиц, характеризующаяся сепсисом, фибринозным перикардитом, перигепатитом, аэросаккулитом, казеозным сальпингитом и менингитом. Возбудителем заболевания является *Riemerella anatipestifer*. Вспышки заболевания регистрируются во всём мире и приводят к существенным экономическим потерям за счёт высокой смертности, снижения темпов роста, плохой конверсии кормов, затрат на лечебно-оздоровительные мероприятия и т.д. По данным Kardos G. и соавт., а также Bisgaard M., риимереллёз птиц преимущественно проявляется в форме инфекционного серозита, сальпингита, артритов и септицемии [12, 50]. Munday B.L., Pierce R.L., Helfer D.H., Hemboldt F. и другие исследователи, подчёркивают, что наиболее восприимчива к болезни птица в возрасте 3-4-х недель, в некоторых случаях до 8 недель. Переболевшая взрослая птица остается носителем, без каких-либо клинических проявлений заболевания, но при этом является основным источником распространения возбудителя [31, 39, 64, 70, 89]. По сообщению Sarver C.F., смертность среди молодняка уток в неблагополучных предприятиях может достигать 75%, что говорит о высокой значимости данного заболевания для промышленного птицеводства [82].

Несмотря на то, что в России в последние годы активно развивается направление утководства и гусеводства, рассматриваемая инфекция (риимереллёз) не контролируется на уровне государственного эпизоотического мониторинга. Борьба с риимереллёзом в Российской Федерации осложнена тем, что практически все инкубационное яйцо поступает из-за границы, где риимереллёз встречается повсеместно. Заболевание широко распространено в странах с высокими темпами развития утководства и гусеводства, а именно Китае, Тайланде, Великобритании, Нидерландах, Японии [19]. Дополнительно стоит отметить, что существенное значение в распространении заболевания по всему

миру имеет миграция диких водоплавающих птиц, при этом не только гусей и уток, но и лебедей, журавлей, аистов и т.д. В этом случае передача возбудителя может происходить при непосредственном контакте дикой и домашней птицы на выпасных полях и водоёмах [16].

2.1.1. Современная таксономия *Riemerella anatipestifer*

Согласно определителю Берджи, род *Riemerella* относится к типу *Bacteroidetes*, классу *Flavobacteria*, порядку *Flavobacteriales*, семейству *Flavobacteriaceae* [96]. Род состоит из трёх видов, а именно: *Riemerella anatipestifer* (впервые описан Hendrickson и Hilbert в 1932 г.), *Riemerella columbina* (впервые описан Vancanneyt M. в 1999 г.), *Riemerella columbipharyngis* (охарактеризован Rubbenstroth D. в 2013 г.) [76, 97]. Согласно данным Sandhu T.S., *R. anatipestifer* имеет устаревшие синонимичные наименования, такие как *Pfeifferella anatipestifer*, *Pasteurella anatipestifer*, *Moraxella anatipestifer* [85]. Родовое название возбудителю было дано в честь Riemer O., впервые описавшего данное заболевание у домашней птицы в 1904 году [16, 40, 41, 47, 64, 73].

2.1.2. Свойства бактерий вида *Riemerella anatipestifer*

Морфология возбудителя

Возбудитель заболевания, *R. anatipestifer*, является неподвижной и не спорообразующей грамотрицательной палочкой размером 0,3-0,5*1-2,5 мкм. В мазках клетки располагаются одиночно, парно или в виде небольших цепочек [1].

Культуральные свойства

Бактерии вида *R. anatipestifer* относятся к требовательным микроорганизмам, в связи с чем для первичного выделения и культивирования целесообразно использовать питательные среды с добавлением 5-10% дефибринированной крови. Наилучшие ростовые свойства микроорганизма наблюдается на средах богатых пептоном и кровью, а также тиамином. Рост на средах, не содержащих дефибринированную кровь, также возможен, но он более

скудный и длительный. На агаре МакКонки рост возбудителя риимереллэза отсутствует [5].

На кровяных средах при культивировании в микроаэрофильных условиях и температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24-48 часов, *R. anatipestifer* образует гладкие, непигментированные колонии диаметром до 5 мм. Проявление гемолиза вокруг колоний является не стабильным свойством, которое зависит от изолята и/или серотипа возбудителя [46, 51, 55, 59, 65].

Диапазон температуры, при которой может наблюдаться рост колоний, достаточно широк и составляет $4-45^{\circ}\text{C}$. На жидких средах возбудитель растёт плохо, исключением является триптиказо-соевый бульон с декстрозой, который используется при производстве иммунобиологических средств против риимереллэза.

Биохимические свойства

Сахаролитические и протеолитические свойства *R. anatipestifer* были описаны в трудах Crasta K.C. и др., Hinz K.H. с соавт., Pathanasophon P. и др. Свойства *R. columbina* были подробно рассмотрены в работе Rubbenstroth D. и др. Вид *R. columbipharyngis* является относительно новым, Rubbenstroth D. с соавторами обособил его лишь в 2013 году [23, 42, 67, 69, 78].

Биохимические свойства всех видов рода *Riemerella* приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биохимические свойства *Riemerella spp.*, используемые для видовой идентификации

Показатель	<i>Riemerella anatipestifer</i>	<i>Riemerella columbina</i>	<i>Riemerella columbipharyngis</i>
1	2	3	4
Каталаза	+	+	+
Оксидаза	+	+	+
Пигментация колоний на колумбийском агаре с дефибринированной кровью	-	+	-
Температурный диапазон для микроаэрофильного культивирования, $^{\circ}\text{C}$	4-45	25-45	30-41

1	2	3	4
Выживаемость на кровяном агаре при 4 °С, суток	31	31	7
Разжижение желатина	+	+	+
Гидролиз эскулина	-	(+)	-
Реакция Фогес-Проскауэра	(+)	+	+
САМР тест	(-)	+	-
Уреаза	V	(+)	-
Образование индола	(+)	-	-
Аргининдекарбоксилаза	-	-	-
b- Глюкозидаза	-	(+)	-
a- Галактозидаза	+	+	+
a- Мальтозидаза	+	+	-
Эстераза	(-)	(-)	-
Валин ариламидаза	+	+	-
Трипсин	(-)	(-)	-
a-Химотрипсин	(+)	(+)	+
Ферментация углеводов			
Глюкоза	(+)	+	+
Трегалоза	(-)	-	-
Мальтоза	(+)	+	+
Фруктоза	(+)	(+)	-
Манноза	(+)	+	+
Декстрин	(+)	+	+

+ – положительное значение теста;

– отрицательное значение теста;

(+) – в большей степени положительное значение теста;

(-) – в большей степени отрицательное значение теста;

v – вариабельное значение.

Как видно из данных, приведённых в таблице №1, бактерии вида *Riemerella anatipestifer* не образуют пигмент на средах с добавлением крови, обладают возможностью разжижения желатина, не вызывают гидролиз эскулина. Обладают a- галактозидазой, a- мальтозидазой, валин ариламидазой и не обладают b- глюкозидазой и аргининдекарбоксилазой. Реакция Фогес-Проскауэра, САМР тест, уреазы, образование индола, эстеразы, ферментация глюкозы, трегалозы, мальтозы, фруктозы, маннозы и декстрина являются переменным свойством и зависят от изолята.

Антигенная структура

Возбудитель риимереллёза имеет достаточно разнообразную антигенную структуру. Sandhu T.S., а также Rubbenstroth D. с соавт. установили, что вид *R. anatipestifer* насчитывает 21 серотип [61, 77, 83, 84]. Pathanasophon P. с соавторами в своих научных трудах указывают, что различные серотипы риимерелл не обладают перекрёстной антигенной активностью [65]. Проведение серотипизации происходит в реакции агглютинации на стекле или в пробирочном варианте.

По данным Hu Q., а также Sandhu T.S. с соавт., наибольшую этиологическую роль в возникновении заболевания в мире имеют серотипы 1, 2, 3, 5, 10 и 15 [45, 83]. При этом авторы отмечают, что серотиповое разнообразие этиологически значимых риимерелл во всём мире не однородно и зависит от региона или страны. Так, в Китае разнообразие патогенных риимерелл значительно шире, чем в других странах, и включает в себя серотипы 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 и 15. В первую очередь это связано с тем, что Китай является мировым лидером по объёмам производимого мяса водоплавающей птицы. В странах, где утководство и гусеводство развито слабо, количество значимых серотипов меньше. Например, по данным Cortez J. с соавт., в Германии наибольшую опасность представляют всего два серотипа, а именно 1 и 13 [22]. Harry E.G. и др. в своих трудах отмечают, что различные серотипы риимерелл обладают разной вирулентностью [38, 93].

Сохранность в окружающей среде и устойчивость к дезинфектантам

R. anatipestifer относится к слабоустойчивым микроорганизмам. По данным Barre B., культуры *R. anatipestifer* чувствительны к общепринятым дезинфицирующим средствам, таким как формалин, фенол, четвертичный аммоний в концентрации 1%. Кроме того, хорошим барьером распространения возбудителя является хлорная известь и каустическая сода. В окружающей среде патоген может сохраняться в воде до одной недели, а в подстилке до четырёх недель, при условии отсутствия в них дезинфицирующих веществ [10].

Устойчивость возбудителя риимереллэза к термической обработке достаточно низкая. Так Harry E.G. и Deb J.R. обозначили, что *R. anatipestifer* инактивируется при 60 °C через 1 час [38]. Hu Q. и др. отмечают, что оздоровительные работы при риимереллэзе осложняются возможностью образования биоплёнок, поддерживающих устойчивость возбудителя [43].

2.1.3. Факторы вирулентности *Riemerella anatipestifer*

По данным Kalynych S., Morona R., Cygler M. основным фактором вирулентности *R. anatipestifer* являются липополисахариды (LPS) клеточной стенки. Липополисахариды *R. anatipestifer* состоят из трех различных компонентов: липида А, О-антигена и основного олигосахарида. При этом LPS, как основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, является мощным стимулятором врожденного иммунного ответа [48, 92]. О-антиген состоит из олигосахаридных повторяющихся единиц, которые обычно содержат от двух до восьми остатков широкого спектра сахаров и их производных. Разнообразие повторов О-антигена показано в виде конформации сахара, их расположения и связей внутри и между О-единицами. Следовательно, повторы О-антигена являются наиболее вариабельными компонентами молекулы LPS, придавая антигенную специфичность [27, 72, 74, 108].

По данным Мохон Е и Kroll J., LPS играет важную роль в защите бактериальной клетки от окисления и высыхания при нахождении возбудителя в агрессивных условиях, предохраняет от воздействия ультрафиолета, температурных перепадов и т.д. Данное свойство можно объяснить тем, что основной компонент капсулы – полисахарид, является гидрофильным и может поддерживать сохранность воды в стенке клетки, обеспечивая ее жизнеспособность. Дополнительным фактором вирулентности *R. anatipestifer* является толстая клеточная стенка, позволяющая ей выживать в крови птицы при сепсисе, вне зависимости от лизоцимной активности крови [26, 63, 100].

Hu Q., R.M. Donlan и J.W. Costerton установили, что *R. anatipestifer* может образовывать биопленки, которые в свою очередь отягощают развитие

патогенеза, так как являются устойчивыми к иммунной системе организма и антибактериальным средствам [24, 25, 29, 57, 107].

Backert S. и Meyer T.F. установили, что желатинолитическая активность является важным биохимическим свойством, характеризующим вирулентность *R. anatipestifer* [9]. Данное предположение также подтверждено Corbel M. с соавт., которые доказали, что желатиназа может разрушать коллаген хозяина, образуя питательные вещества для патогена и тем самым усиливая агрессивность возбудителя [21, 60, 99].

Также роль ферментов, как факторов вирулентности, описана авторским коллективом Guo Y., Hu D., Guo J., Wang T., Xiao Y., Wang X., Li S., Liu M., Li Z., Bi D. и Zhou Z. Вирулентность *R. anatipestifer* зависит не только от желатиназы, но и от ферментов, относящиеся к субтилизин-подобным сериновым протеазам, которые при взаимодействии с комплементарными белками позволяют уклоняться бактериальному агенту от врождённого иммунного ответа птенцов [36, 44, 101].

2.1.4. Видовая восприимчивость

По данным Rubbenstroth D. и др., риимереллёзу подвержены утки, гуси, индейки, лебеди, фазаны, при этом авторами отмечается, что фактический механизм распространения возбудителя между разными видами птиц в настоящее время полноценно не изучен [65, 79]. Rosenfeld L.E. в своих работах описал случай инфекции у цыплят, но без развития типичных для риимереллёза клинических признаков [75]. Корейские специалисты Cha S.Y. с соавт., установили циркуляцию возбудителя среди дикой птицы, ввиду чего птицы свободноживущих видов должны рассматриваться как резервуар инфекции, что следует учитывать при планировании и обеспечении противозооотических мероприятий на неблагополучных по заболеванию предприятиях [16].

2.1.5. Предрасполагающие к развитию заболевания факторы

Риемереллёз является самостоятельным заболеванием птицы водоплавающих видов, однако наличие predisposing факторов значительно влияет на скорость развития патогенеза заболевания и отягощает последствия возникновения инфекции. Armand C., и Ryll M., с соавт. отмечают несколько основных факторов, способствующих развитию заболевания.

К основным predisposing факторам следует отнести:

- первичные вирусные инфекции, которые открывают ворота секундарной микрофлоре, путём компрометирования механизмов лёгочной защиты, что predisposes дыхательные пути к колонизации бактериальным агентом. Яркий пример ассоциированного течения заболевания приводится в работах Soike D. с соавт. и Todd D., которые рассматривают циркувирусную инфекцию уток (DCV) и риемереллёз [33, 90, 94]. Вторым примером ассоциированного течения риемереллёза можно считать герпесвирусную инфекцию, которая протекает латентно, но приводит к сильной иммуносупрессии носителя, что увеличивает его восприимчивость к иным патологиям [6, 13, 14, 28];
- вторым predisposing фактором являются паразитарные заболевания, в следствии механического повреждения органов и тканей птицы, а также интоксикации организма выделяемыми метаболитами;
- третьим фактором являются стрессы, например, обрезание клюва, ограниченное питание, переуплотнение, вакцинации и т.д.;
- четвёртым важным фактором стоит считать плохое санитарное состояние предприятия, а также нарушение зоогигиенических условий содержания [80].

2.1.6. Пути передачи возбудителя

Sarver C.F., Morshita T.Y. и Nergessaian B. отмечают, что пути передачи возбудителя от птицы к птице могут быть контактными, аэрогенными, алиментарными. При этом происходит инфицирование тех особей, у которых имеются механические повреждения слизистых оболочек, т.е. травмы, ранки,

язвы. Кроме того, некоторыми авторами отмечается возможность передачи возбудителя эктопаразитами птиц [87].

Glünder G. и Hinz K.H. смогли доказать овариальный (вертикальный) путь передачи возбудителя [32, 87, 98].

Имеются литературные данные о ассоциированном течении заболевания, усугубляющем исход болезни. Так, Rubbenstroth D. описал случай проявления риимереллёза на фоне метапневмовирусной инфекции [79]. Hendrickson J.M. и Hilbert K.F. в 1932 году смогли установить и доказать, что пероральное инфицирование утят риимереллами сложно реализуемо, так как сами проводили заражение в течение 10 дней [40]. Авторскому коллективу Graham R., Brandly C.A., Dunlop G.L. в 1938 году удалось воспроизвести экспериментальную инфекцию у утят путём их внутрибрюшинного, внутривенного и внутритрахеального заражения [34]. Данные выводы в 1956 году подтвердил Asplin F.D., установивший, что заражение утят возможно контактным путём через раны, царапины, трещины или проколы на коже [8].

2.1.7. Клинико-морфологическое проявление риимереллёза

В отечественной литературе, к сожалению, отсутствуют работы, описывающие формы проявления риимереллёза. Согласно данным зарубежных исследователей, например Sandhu T.S., риимереллёз поражает уток в возрасте до 8 недель, но, преимущественно, гибель фиксируется среди утят 3-4-х недельного возраста. У взрослых особей заболевание переходит в хроническую форму, при которой птица является активным бактерионосителем [83]. По мнению этих же авторов, риимереллёз протекает по септическому типу и может быть первичной инфекцией, т.е. для её возникновения не обязательны сопутствующие факторы, однако их наличие значительно отягощает течение болезни. Smith J.M. и др. отмечают, что основными патоморфологическими признаками данного заболевания является фибринозный серозит, перикардит, перигепатит, менингит, сальпингит и артрит [62, 89].

При искусственном инфицировании у утят через пять-шесть дней развивается одышка и становится заметно отставание в росте. У некоторых из них отмечается слабость ног, из-за чего они не могут стоять. В последующем у птиц развивается типичное для заболевания экссудативное воспаление, включая перикардит, аэросаккулит и перигепатит.

При проведении патологоанатомического исследования отмечается фибринозный перикардит, миокардит или очаговые некрозы в сердце. Печень с явлениями фибринозного перигепатита и лимфоидного истощения. Очаговая пневмония, фибринозный аэросаккулит, отек и клеточная инфильтрация легочной ткани.

2.2. Лабораторная диагностика

Стандартизированная процедура диагностики риемежеллёза в Российской Федерации в настоящее время отсутствует, ввиду чего диагноз устанавливается путём использования стандартных ветеринарных и микробиологических подходов. Для этого проводится оценка эпизоотического состояния предприятия, исследуются и анализируются клинико-морфологические проявления заболевания, и проводится лабораторно-диагностические исследования, целью которых является выделение чистой культуры *R. anatipestifer*.

В качестве секционного материала для исследования от павшей или вынужденно убитой птицы отбирают мозг, печень, селезенку, сердце. Дополнительно, в случае септического процесса, можно использовать кровь. Отобранный материал целесообразно исследовать сразу, но если это невозможно, образцы могут быть подвергнуты однократному замораживанию при температурном режиме не выше минус -18 °C [35, 41].

Кусочки исследуемых тканей после предварительной обработки спиртом и пламенем, разрезаются стерильными инструментами так, чтобы получить ровный срез ткани для посева на среду. Посев проводится на агар, содержащий 5-10% дефибринированной крови барана, с последующим культивированием в условиях 5% CO₂ атмосферы в течение 24-48 часов. Видовая идентификация бактерий

проводится посредством использования рутинных методов микробиологии, а именно изучением сахаролитических и протеолитических свойств с использованием сред Гисса. Помимо рутинных методов бактериологии, идентификацию *R. anatipestifer* можно реализовать методами молекулярной биологии (секвенирование) и времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF).

Серотипизация изолятов риимерелл проводится в реакции агглютинации со стандартными антисыворотками по методу, предложенному Bisgaard M. [11]. В случае выраженности перекрёстной положительной реакции изолята с несколькими антисыворотками, проводится пробирочная реакция агглютинации или же реакция иммунодиффузии по методу Pathanasophon P. [65].

Для постановки окончательного диагноза риимереллёз должен быть дифференцирован от пастереллёза, эшерихиоза, сальмонеллёза, аспергиллёза, а также стрептококкоза, вызванного *Streptococcus gallolyticus*.

2.3. Лечебные мероприятия при риимереллёзе

Использование антибактериальных препаратов, по сообщению ряда иностранных специалистов, является обоснованным средством борьбы с риимереллёзом, но ввиду возрастающих темпов развития антибиотикорезистентности, эффективность такой терапии постоянно снижается. Кроме того, как уже было сказано выше, рассматриваемый возбудитель обладает способностью формировать биопленки, что является дополнительным фактором к развитию антибиотикорезистентности. Так, уже установлена антибиотикорезистентность к хлорамфениколу, флорфениколу, фторхинолонам и т.д. [17, 18, 91].

По данным Köhler B., Heiss R., Albrecht K., возбудитель чувствителен к энрофлоксацину, амоксициллину, новобиоцину, спирамицину, тетрациклину; устойчив к пенициллину, стрептомицину, сульфаниламидам. Все штаммы риимерелл устойчивы к полимиксину В, колистину, неомицину, канамицину [52].

Ввиду множественной резистентности возбудителя и принятия мер со стороны Россельхознадзора, отслеживающего содержание в продукции

птицеводства остаточных количеств антибактериальных средств, повышается важность иных методов сдерживания инфекции, например, использования специфической этиотропной терапии и вакцинации.

2.4. Специфическая профилактика риимереллёза

Graham R. и Hendrickson J.M. в своих трудах отмечают возможность вакцинации птицы против риимереллёза ввиду того, что естественно переболевшие птенцы становятся устойчивыми к последующему заражению, поэтому попытки разработать эффективное средство не прекращаются [22, 34, 40, 49, 68, 104].

В настоящее время иностранными специалистами уже была изучена возможность специфической профилактики риимереллёза. Так, Sandhu T.S. предложил использовать живые биопрепараты из слабовирулентных культур. Liu H. с соавторами рассматривали возможность профилактики инаktivированным препаратом, Pathanasophon P. и др. изучали эффективность токсоидных препаратов, не содержащих бактериальные клетки [56, 66, 84]. Из всех перечисленных вариантов, наилучший результат был продемонстрирован при использовании бактериин-препаратов, но рядом авторов отмечено, что бактериин вакцины против риимереллёза не обладают возможностью формирования перекрёстного иммунитета на несколько серотипов возбудителя [66, 86]. Именно поэтому положительные результаты вакцинации достигаются при использовании препаратов, изготовленных из циркулирующих на предприятии изолятов, т.е. использованием аутовакцин, но в России это решение не согласуется с Федеральным законом N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств".

Авторским коллективом D.A. Higginsa, R.R. Henry, Z.V. Kounev отмечается, что иммунизация птицы живой вакциной из слабовирулентной культуры, приводит к формированию слабого иммунитета, но более длительного по сравнению с инаktivированным препаратом [41]. По данным Harry E.G., Sandhu T. и Floren U., продолжительность иммунитета у птиц, вакцинированных инаktivированным препаратом, не превышает 7-8 недель, в то время как живые

вакцины обеспечивают более длительный период невосприимчивости [30, 38, 81]. Higgins DA, Henry RR, Kounev ZV. в своей работе отмечают, что живая вакцина, несмотря на возможность образования более длительного иммунитета, по сравнению с инактивированными препаратами, имеет негативное влияние на птицу, снижая скорости роста и продуктивность [41, 103].

Возможность эффективного использования вакцинации молодняка отмечена в научной работе L. Lobbedey и B. Schlatterer, которые при разработке диагностикума на основе ИФА, определили наличие антител у утят, полученных от вакцинированных родителей, что подтверждает возможность обеспечения защиты молодняка от заболевания путем иммунизации взрослой птицы [58].

Интересным является и то, что длительность иммунитета, переданного птенцам через яйцо, посредством предварительной иммунизации родительского стада, позволяет обеспечить краткосрочный иммунитет на срок 7-12 суток. Именно поэтому научный коллектив D.A. Higgins, R.R. Henry и Z.V. Kounev в целях оздоровления поголовья уток рекомендует вакцинацию молодняка, полученного от вакцинированного родительского поголовья на 14 день жизни [41]. Кроме этого, L. Lobbedey и др. отмечают необходимость использования бустерной иммунизации, при которой родительское поголовье птицы должно подвергаться иммунизации каждые 2 месяца, поскольку образуемых титров антител недостаточно для обеспечения защиты всех птенцов, полученных от двукратно вакцинированного родительского поголовья [58].

2.5. Заключение

По данным литературных источников риемереллёз является серьёзной проблемой промышленного птицеводства во всём мире, в том числе и в нашей стране. Объемы производства мяса водоплавающей птицы в России имеет существенное значение для экономических показателей сельскохозяйственной отрасли, но отсутствие надлежащего контроля за инфекционными заболеваниями приводит к недополучению продукции, затратам на лечение, оздоровление и т.д. Риски развития инфекционной патологии пропорционально увеличиваются с

ростом численности поголовья. Отсутствие научных данных о встречаемости и клинико-морфологическом проявлении риимереллёза на территории РФ не должно рассматриваться как отсутствие этого заболевания в стране.

Сложность борьбы с данной инфекционной патологией заключается в отсутствии современных данных о её распространённости в стране, отсутствием регламентирующих документов по проведению лабораторно-диагностических исследований с целью подтверждения диагноза, а также отсутствием средств специфической профилактики. При этом факт, что некоторыми авторами отмечается возможность инфицирования фазанов, кур, цесарок, перепелов, куропаток и т.д., включает данные виды птиц в группу риска по рассматриваемой патологии, т.е. риимереллёз стоит рассматривать как поливидовое заболевание всех сельскохозяйственных и вольерных видов птиц.

В связи с этим необходимо получить отечественные научные данные о риимереллёзе и его возбудителе, имеющие прикладное значение для Российского птицеводства.

На основании анализа данных литературы можно заключить, что к началу нашей работы остались нерешенными следующие вопросы:

- в доступной отечественной литературе отсутствует информация о распространённости риимереллёза в стране;
- в современной научной литературе нет сведений о серотиповом разнообразии возбудителя *R. anatipestifer* циркулирующего на территории РФ;
- не разработаны нормативные документы по диагностике заболевания на территории РФ;
- на рынке отсутствуют отечественные средства специфической профилактики риимереллёза водоплавающих птиц.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Материалы

Научная работа была выполнена в период с 2016 по 2019 гг. на базе 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» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Изучение эпизоотической ситуации, клинические обследования птицы, патологоанатомические исследования, отбор материала для лабораторных исследований проводили на птицеводческих предприятиях Краснодарского и Алтайского краёв, Республиках Башкортостан, Татарстан и Чувашия, Оренбургской, Ростовской, Рязанской, Тамбовской, Астраханской, Нижегородской и Курганской областях. Образцы материала от дикой перелетной птицы получены из Владимирской, Вологодской, Калужской, Псковской, Тульской, Ростовской, Рязанской, Тамбовской, Курской, Липецкой, Белгородской областей, а также республик Татарстан и Башкортостан, Краснодарского и Ставропольского краев.

Бактериологические исследования, а также изучение морфологических, тинкториальных, культуральных, патогенных, серологических свойств изолятов риимерелл проведено в лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и на опытной базе острова Лисий Вышневолоцкого района Тверской области.

Экспериментальные серии вакцины изготавливали в лабораторных условиях ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Испытание эффективности, безвредности, антигенной активности биопрепарата проводили в ООО «Племптице завод Благоварский» Республики Башкортостан и на опытной базе Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

При выполнении научной работы были использованны материалы:

Штаммы микроорганизмов: полевые изоляты возбудителя (№478, №490, №512, №513, №549, №566, №571, №602, №617), коллекционные и музейные

штаммы бактерий семейства *Flavobacteriaceae* из коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, а также эталонные культуры для контроля питательных сред и диагностикумов.

Питательные среды: дифференциально-диагностические и элективные питательные среды: модифицированный эскулиновый агар, агар МакКонки, агар с феноловым красным, колумбийский агар, сердечно-мозговой агар, триптиказо-соевый агар, мясо-пептонный агар, триптон-цистиновый агар, триптон соевый агар; а также нитратный бульон, триптиказо-соевый бульон с декстрозой, пептонная вода с индикатором Андреде, триптон соевый бульон, бульон с бромкрезоловым пурпурным, эугоник бульон, мясо-пептонный бульон, бульон Хоттингера, выпускаемые компанией «Himedia» (Индия) и фирмой «Oxoid» (Великобритания).

Диагностические наборы: для изучения протеолитических и сахаролитических свойств выделенных изолятов бактерий с целью их родовой и видовой идентификации использовали углеводы в дисках: адонит, арабиноза, галактоза, D-глюкоза, дульцит, инозит, инулин, ксилоза, мальтоза, маннит, манноза, раффиноза, рамноза, салицит, сорбит, сахароза, трегалоза, фруктоза, целлобиоза, выпускаемые компанией «Himedia». Дополнительно видовая идентификация микроорганизмов проводилась методом масс-спектрометрического анализа MALDI-ToF.

Расходные материалы и реактивы: набор для окраски по Граму, вода дистиллированная, деминерализованная вода, диски для определения чувствительности к антимикробным препаратам, полиэтиленгликоль-6000, гидроокись алюминия, мертиолят натрия, ПЦР-буфер, пробирки стеклянные лабораторные, пипетки стеклянные лабораторные разного объема, пипетки стерильные одноразовые пластиковые, чашки Петри, пробирки «Eppendorf», ампулы стеклянные, ватно-марлевые фильтры, колбы мерные, матрасы лабораторные стеклянные и другие стеклянные стерильные емкости разного объема, бактериальные петли, шприцы одноразовые стерильные инсулиновые, шприцы одноразовые стерильные объемом 1,0 и 2,0 см³, флаконы емкостью 50 и

100 см³, бутылки объемом 3 и 6 литров, стекла покровные, стекла предметные и т.д.

Лабораторное и промышленное оборудование: холодильник Indesit, термостат Sanyo MIR-262, микроскоп Jeneval, автоклав ВК-75, весы электронные AND GX-200, автоматические пипетки-дозаторы одно- и восьмиканальные объемами 10-200 мкл Biohit mLINe, pH-метр selecta ph-2005 ph meter, набор ОСО мутности бактериальных взвесей ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, стандарты мутности по МакФарленду, центрифуга Treewe 6LR, стерилизующие фильтры СФ-300, аппарат для лиофилизации Christ epsilon 1-4, система для взятия крови и т.д.

Животные: белые мыши массой 16-18 г. – 82 шт., 1 баран-донор, утки различных возрастных групп – 902 гол.

3.2. Методы

3.2.1. Микробиологические

Изучение эпизоотической ситуации по риимереллёзу водоплавающей птицы проводили путем обследования хозяйств, основываясь на собственных результатах фиксации случаев заболевания и бактериологических исследований патологического материала, отобранного и/или поступившего из птицеводческих предприятий различных регионов страны.

Микробиологическое исследование с целью установления окончательного диагноза на риимереллёз проводили с использованием рутинных бактериологических и серологических методов.

Бактериальные культуры и мазки отпечатки из патологического материала, после предварительного окрашивания методом Грама, микроскопировали с целью изучения морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмов.

Изучение сахаролитических и протеолитических свойств культур микроорганизмов проводили с использованием сред Гисса, содержащих различные углеводы и бромкрезоловый пурпурный в качестве индикатора образования

кислоты, а также коммерческих наборов для биохимической идентификации бактерий: ENTERO-Rapid 24, STREPTOtest 16, STAPHYtest 16 и др.

Патогенность и вирулентность изолятов *Riemerella anatipestifer* определяли в опытах на лабораторных животных, а также птицах естественно восприимчивых видов – утках. Заражение лабораторных животных проводили путем внутрибрюшинного введения двухсуточных агаровых культур, выращенных на кровяном агаре в условиях CO₂ атмосферы с концентрацией 1 - 3 млрд. м. к./см³, согласно методике, предложенной Sarver C.F. [87]. Каждым штаммом в указанных разведениях заражали по 4 белых мыши, объем инфицирующей суспензии составлял 0,5 см³. Инфицировали утят внутримышечно, объем вводимой суспензии составлял 0,5 см³. Продолжительность наблюдения за белыми мышами и утятами составляла 10 дней или до момента их гибели.

Определение концентрации бактериальных клеток проводили двумя методами, первый из которых - чашечный метод Коха, предназначенный для определения количества жизнеспособных клеток, а также визуальным методом при использовании стандартов оптической плотности [3].

Определение антибиотикочувствительности культур микроорганизмов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Интерпретация результатов проводилась в соответствии с рекомендациями CLSI и EUCAST.

3.2.2. Биотехнологические

Лиофилизация изолятов *Riemerella anatipestifer* проводилась согласно технологии, подробно описанной в стандарте организации «СТО 00496165-0003-2018 Производственные и контрольные штаммы *Riemerella anatipestifer* (метод изготовления и контроля посевных материалов)» [приложение 4].

Дефибрированную кровь для производства питательных сред получали от барана-донора. Методика получения описана в ГОСТ 31746-2012 (ISO 6888-1:1999, ISO 6888-2:1999, ISO 6888-3:2003) «Продукты пищевые.

Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*».

Накопление бактериальной массы *R. anatipestifer* проводили методом поверхностного культивирования на чашках Петри и матрасах, а также глубинного культивирования в бутылках по общепринятой методике.

Инактивация бактериальных антигенов осуществлялась путём добавления 0,3 % формалина к общему объёму бульонной культуры, продолжительность инаktivации составляла 14 дней при температурном режиме плюс 21 ± 1 °C.

Концентрирование бактериальной массы пилотных (экспериментальных) серий препарата было проведено центрифугированием.

Полноту инаktivации культур *R. anatipestifer* определяли по отсутствию жизнеспособных клеток в концентрированном антигене и скомпонованном препарате путем посева на ростообеспечивающие питательные среды, а также по безвредности инаktivированной бактериальной массы в биопrobe на лабораторных мышах массой 16-18 гр. при подкожном введении в однократной дозе объёмом 0,5 см³ и дозе, двукратно превышающей рекомендованную. Для оценки безвредности каждой серии антигена использовалось по две подопытные мыши. Наблюдение за опытными животными продолжалось в течение 10 суток. Препарат считался инаktivированным в случае отсутствия роста культуры *R. anatipestifer* на питательных средах, а также отсутствию каких-либо местных и системных реакций, в том числе гибели, подопытных животных.

Контроль стерильности антигенов и моновакцин был выполнен в полном соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения».

3.2.3. Клинические

В работе использовали общие методы клинического исследования: осмотр, пальпацию, аускультацию и термометрию.

3.2.4. Патоморфологические

Макроскопическое исследование органов и тканей проводили согласно «Методическим указаниям по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях». Вскрытие трупов, павших и вынужденно убитых лабораторных животных, и птицы осуществляли методом полной эвисцерации.

3.2.5. Иммунобиологические

Серотипирование изолятов **риемерелл** проводилось по методикам, предложенным Sandhu T. и E.G. Harry, путем постановки реакции агглютинации на стекле при смешивании исследуемой культуры с сыворотками крови, полученными от птиц, вакцинированных различными штаммами **риемерелл** [83]. Критерием оценки являлась интенсивность образования агглютинации с оценкой в крестах от 1 до 4, где 1 крест означает минимальную реакцию, а 4 креста максимальную.

С целью исключения неспецифической реакции агглютинации на стекле проводилась постановка пробирочной реакции агглютинации. Антигены получали при культивировании возбудителя на триптиказо-соевом агаре, с последующей инактивацией антигена 0,3% формалином. После инактивации антигена, его концентрацию доводили до оптической плотности равной 0,2 при длине волны 525 нм. По предложенной методике, разведения сыворотки находились в пределах 1:10 – 1:1280. Для постановки реакции в пробирку вносили равный объём антигена и антисыворотки в соответствующем разведении. Смесь выдерживали при 37°C в течение 18-24 часов. В качестве отрицательного контроля использовали нормальную кроличью сыворотку.

3.2.6. Методы молекулярной биологии

Секвенирование микроорганизмов проводилось путем определения нуклеотидной последовательности определенного участка генома (16s rRNA) изучаемого изолята бактерий с последующим сравнением полученной

последовательности с ранее известными последовательностями в базе GenBank. Ген 16s rRNA является высоко консервативным и стабильным фрагментом на хромосоме всех прокариот. Сравнение последовательностей генов 16S rRNA позволяет дифференцировать организмы на уровне рода и вида по всем основным семействам бактерий.

3.2.7. Метод масс-спектрометрии (MALDI-ToF)

Для видовой идентификации бактерий применяли времяпролетную масс-спектрометрию, исследования проводили согласно «МР 4.2.0089-14 Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 24 апреля 2014 г.

3.2.8. Статистическая обработка результатов

При анализе и обработке результатов исследований использовали компьютерные программы BioStat 2009 и Microsoft Excel.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Клинико-морфологическое проявление риимереллёза

В ходе выполнения научно-исследовательской работы, в период 2016-2019 гг., нами были изучены случаи возникновения риимереллёза водоплавающей птицы в промышленных и частных предприятиях двенадцати регионов Российской Федерации: Краснодарском и Алтайском краях, Республиках Башкортостан, Чувашия и Татарстан, Оренбургской, Ростовской, Рязанской, Тамбовской, Астраханской, Нижегородской и Курганской областях. Во всех обследованных предприятиях были зафиксированы клинико-морфологические проявления инфекционного заболевания, характерные в том числе и для риимереллёза. Окончательный диагноз был установлен посредством проведения лабораторно-диагностических исследований (бактериологическим методом) в лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Помимо исследования птицы, содержащейся в промышленных условиях, проведена работа по определению носительства бактерий *R. anatipestifer* среди дикой птицы, которая была получена из Владимирской, Вологодской, Калужской, Псковской, Тульской, Ростовской, Рязанской, Тамбовской, Курской, Липецкой, Белгородской областей, а также республик Татарстан и Башкортостан, Краснодарского и Ставропольского краев. Отстреленная птица поступала в лабораторию цельной тушкой и/или отдельно отобранными органами, в замороженном или охлажденном виде (в зависимости от сроков транспортировки в лабораторию).

Клинический осмотр больной птицы проводили непосредственно на производственных площадках или в условиях лаборатории, куда птица доставлялась живой. Проведенное обследование позволило определить наиболее типичные для риимереллёза клинические проявления. Было установлено, что заболевание может протекать в четырех различных формах, а именно: респираторной, септической, желудочно-кишечной и нервной, что в полной мере соответствует данным иностранных специалистов. Вне зависимости от формы проявления инфекции, общими признаками являются слабость, снижение

подвижности, отказ от корма, замедление темпов роста, повышение температуры тела.

Респираторная форма заболевания проявлялась преимущественно в виде истечений из глаз и носовых отверстий (казеозный или фибринозный синусит), зачастую гнойного характера, кашлем и чиханием. Септическая форма инфекции протекает в виде бактериемии с нарастающей интоксикацией организма. Желудочно-кишечная форма проявляется развитием диареи с характерным зеленоватым оттенком фекалий. Нервная форма риемереллёза встречается достаточно редко, как правило, поражается более взрослая птица, при этом болезнь проявляется частичной или полной потерей ориентации и произвольными некоординированными движениями, тремором головы и искривлением шеи, судорогами, опистотонусом, плавательными движениями конечностей в спинном положении.

При проведении патологоанатомического исследования вынужденно убитой птицы из различных птицеводческих предприятий, преобладали следующие признаки: уплотнение кожных покровов и подкожной клетчатки, развитие дерматита в области брюшной стенки и/или спины, наиболее чётко проявляющееся к 25-40 дневному возрасту (рисунок 1).

В области поражения наблюдали интенсивное отшелушивание частиц кожи, в виде большого количества перхоти, отёк подкожной клетчатки в виде студенистого инфильтрата в области грудной стенки, а также скопление гнойного экссудата.



Рисунок 1 – Уплотнение кожных покровов в области спины у 25 дневного гусёнка с развитием гиперкератоза, алопеций и некротического дерматита

При вскрытии трупов птицы, павшей от риимереллёза, обнаруживали следующие поражения органов брюшной полости: застойная гиперемия печени с явлениями белковой (зернистой) или жировой дистрофии (рисунок 4). При этом увеличение печени с жировой дистрофией зафиксировано у птиц всех возрастных групп, что вероятно стоит ассоциировать с типом кормления. В случае белковой (зернистой) дистрофии изменения связаны с инфекционной или токсической этиологией заболевания, и фиксировалась она преимущественно у птицы в возрасте не старше трех месяцев. Белковая дистрофия также наблюдалась и в почках. Дополнительно стоит отметить развитие фибринозного или фибринозно-некротического перигепатита [53].

Общий вид внутренних органов с патологоанатомическими изменениями у вынужденно убитого гусенка представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 – Патологоанатомические изменения органов и тканей у гусёнка

Во всех случаях отмечали увеличение селезёнки, сопровождающееся отёком и, иногда, очаговым некрозом. У птицы в возрасте старше 4 недель наблюдался фибринозный периспленит.

Исследование органов пищеварительной системы показало преобладание признаков катарального воспаления желудка и кишечника с инъецированием сосудов, а иногда и с кровоизлияниями (рисунок 3).



Рисунок 3 – Острый катарально-геморрагический энтерит

При вскрытии грудной полости чаще всего фиксировали фибринозный перикардит и эпикардит, дряблость сердечной мышцы с явлениями дистрофии, и отложением фибрина (рисунок 5-7). Со стороны респираторных органов выявили наиболее типичные признаки острого интерстициального отёка лёгких, серозную пневмонию, серозно-фибринозный плеврит, фибринозную бронхопневмонию, трахеит, фибринозный аэросаккулит.



Рисунок 4 - Белковая (зернистая) дистрофия и застойная гиперемия печени

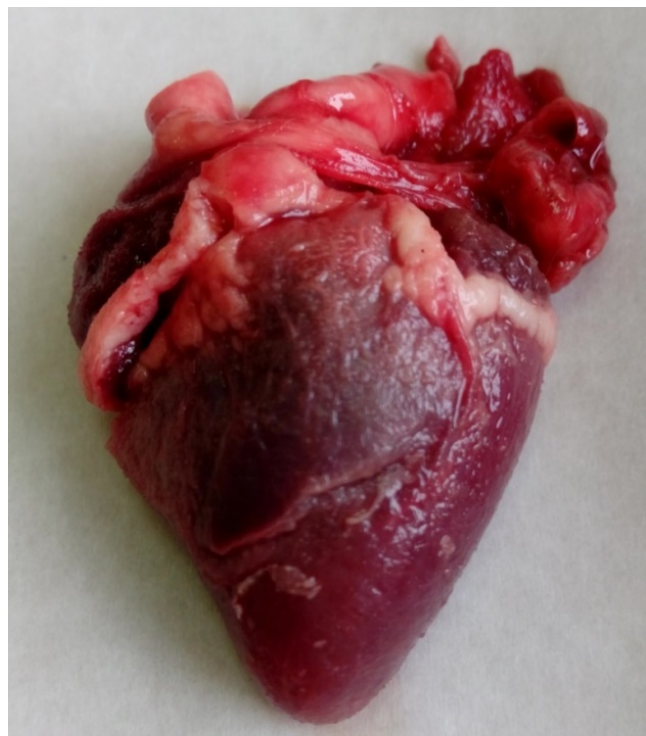


Рисунок 5 - Фибринозный эпиперикардит у 25 дневного гусёнка



Рисунок 6 - Фибринозное воспаление сердечной сумки (перикарда)



Рисунок 7 - Фибринозное воспаление наружного серозного слоя (эпикарда)

У взрослых переболевших особей отмечено развитие казеозного или фибринозного сальпингита, приводящего к снижению или к полной потере яйценоскости.

Дополнительно было отмечено, что риемереллёз у птиц сопровождается хроническим артритом, иногда протекающим с эрозией суставного хряща. У более взрослой птицы, в возрасте 40-50 дней и старше, нередким явлением был гнойный синовит.

Приведённые клинические признаки и патологоанатомические изменения имели схожие черты с эшерихиозом, сальмонеллёзом, пастереллёзом и хламидиозом, поэтому данные инфекционные болезни должны быть исключены при диагностике лабораторными методами. Хламидиоз и вирусные заболевания, свойственные водоплавающей птице, исключали проведением молекулярных исследований методом ПЦР. Пастереллёз и сальмонеллёз в большинстве обследуемых хозяйств был исключён микробиологическими исследованиями. Наиболее часто встречающимся агентом была *Escherichia coli*. В обследованных хозяйствах региональными лабораториями был поставлен диагноз эшерихиоз. Назначенный для борьбы с заболеванием антибиотик (колистин) не демонстрировал положительного терапевтического эффекта, поэтому для снижения смертности среди молодняка ветеринарными специалистами предприятий опытным путем были подобраны более эффективные антибактериальные средства: флорфеникол, доксициклин и энрофлоксацин. Но, не зависимо от длительности курса обработок, эффект наблюдался лишь при использовании антибиотиков, а при их отмене клинические признаки заболевания возобновлялись, что подтверждало бактериальную природу и неверно поставленный диагноз.

С целью постановки окончательного диагноза нами были осуществлены лабораторно-диагностические исследования клинического и секционного материала. Для микробиологического исследования отбирали живых утят и гусят с признаками болезни в возрасте от 14 до 40 дней. От вынужденно убитых птиц после патологоанатомического исследования отбирали кусочки сердца, печени,

лёгочных тканей, селезенки и кровь из сердца для проведения бактериологических исследований.

4.2. Результаты бактериологического исследования

При бактериологических исследованиях материала, проводимых с целью индикации *R. anatipestifer*, параллельно проведен микробиологический скрининг сопутствующей бактериальной микрофлоры, выявляемой из крови сердца при септической форме болезни. Данное исследование позволило получить результаты, характеризующие ассоциированную бактериальную инфекцию, а также обосновать возможный состав ассоциированных препаратов для специфической профилактики болезней, протекающих в сочетании с риемереллёзом.

Аналогичные исследования проведены и при изучении микробиома организма перелётной птицы, представляющей огромную опасность для промышленного птицеводства за счет миграций. Полученные в рамках выполнения этого этапа исследований результаты, могут быть использованы при разработке новых иммунобиологических лекарственных средств, так как при определении структуры бактериальных агентов, циркулирующих на промышленных предприятиях, возможно выявить и установить новые этиологически значимые возбудители, которые целесообразно было бы включать в состав вакцин.

Для определения микробиома организма промышленной птицы нами было проведено исследование образцов материала, поступавшего из 12 предприятий различных регионов страны, при этом из каждого предприятия подвержено исследованию по 10 птиц в возрасте от 2 до 8 недель с типичными для заболевания формами инфекционной патологии. Отбор образцов, а именно лёгкого, сердца, печени, кишечника и яйцевода, для исследования в лаборатории, проводили непосредственно на предприятии. Пробы упаковывали в стерильные одноразовые контейнеры с последующей однократной заморозкой, либо доставляли птиц живьём или в виде целых тушек. Общее количество

исследованных проб от птицы, содержащейся в промышленных условиях, составило 120 образцов. Стоит отметить, что исследование видового разнообразия бактериальной микрофлоры организма промышленной птицы проводили в неблагополучных по риимереллёзу предприятиях.

При выполнении данного этапа исследования из сердца был выделен следующий спектр бактериальных агентов: *Acinetobacter ursingii*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus viridans*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bordetella avium*, *Brevibacterium casei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromohalobacter beijerinckii*, *Chryseobacterium endophyticum*, *Chryseobacterium hominis*, *Corynebacterium durum*, *Corynebacterium xerosis*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus plantarum*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Facklamia sourekii*, *Flavobacterium aquatile*, *Kytococcus schroeteri*, *Lelliottia amnigena*, *Leminorella richardii*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Moraxella lacunata*, *Myroides odoratimimus*, *Neisseria bacilliformis*, *Oligella ureolytica*, *Pantoea agglomerans*, *Pasteurella aerogenes*, *Pasteurella multocida*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pragia fontium*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas taetrolens*, *Riemerella anatipestifer*, *Rothia endophytica*, *Rothia nasimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus warneri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pasteurianus*, *Streptococcus pluranimalium*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rubneri*, *Trueperella pyogenes*, *Vagococcus fluvialis*, *Veillonella parvula*.

Общее количество выделенных микроорганизмов, составило 68 видов. Полная структура микробиома, определенного в рамках исследования материала от птицы (по семействам), отражена на рисунке №8.

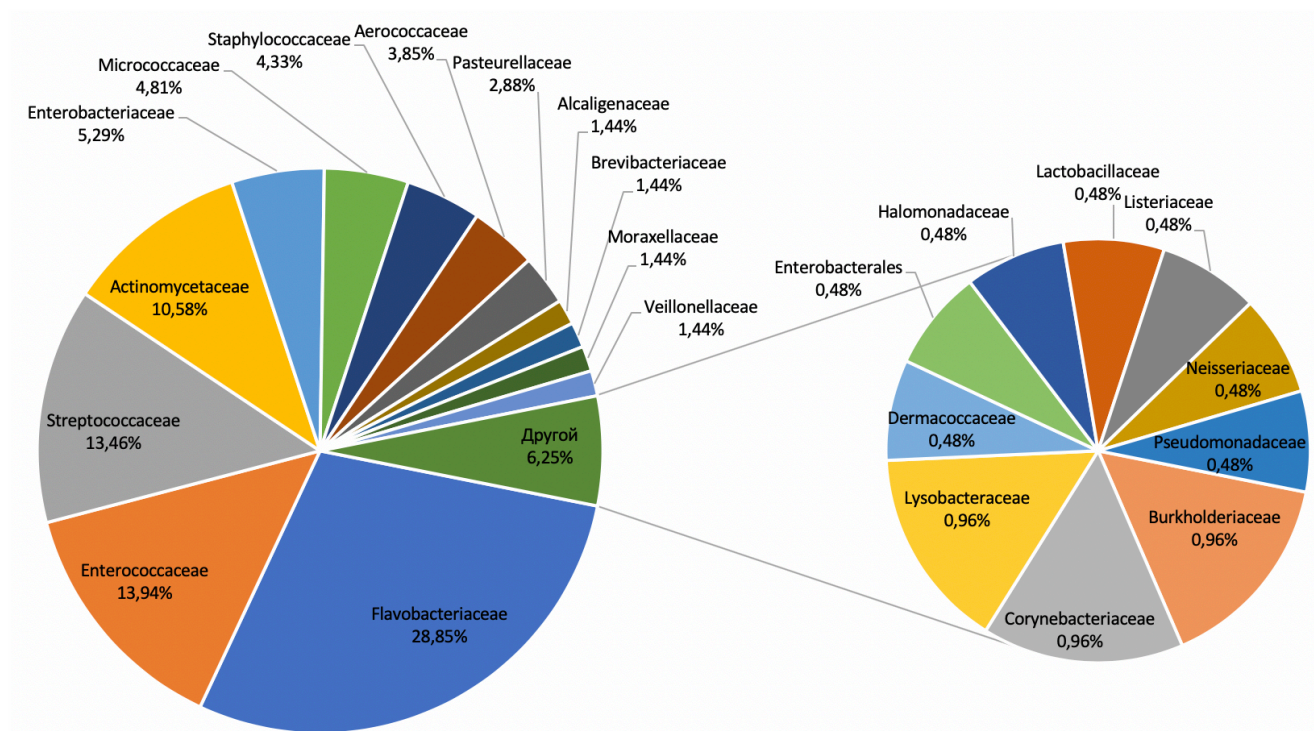


Рисунок 8 – Структура бактериальной микрофлоры, выделенной из сердца водоплавающей птицы, содержащейся в условиях промышленных предприятий

Согласно данным графического рисунка № 8, можно сделать следующие заключения: в структурном составе бактериальных агентов, выделенных из сердца водоплавающей птицы, преобладают семейства *Flavobacteriaceae* – 28,85%; *Enterococcaceae* – 13,94%; *Streptococcaceae* – 13,46%; *Actinomycetaceae* – 10,59%; *Enterobacteriaceae* – 5,29%; *Micrococcaceae* – 4,81%; *Staphylococcaceae* – 4,33%; *Aerococcaceae* – 3,85%; *Pasteurellaceae* – 2,88%; *Alcaligenaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Moraxellaceae* и *Veillonellaceae* по 1,44%; *Burkholderiaceae*, *Corynebacteriaceae* и *Lysobacteraceae* по 0,96%; *Dermacoccaceae*, *Enterobacterales*, *Halomonadaceae*, *Lactobacillaceae*, *Listeriaceae*, *Neisseriaceae*, *Pseudomonadaceae* по 0,48% соответственно.

Среди всех выделенных видов особое значение имеют бактерии семейства *Flavobacteriaceae* и *Pasteurellaceae*, как возбудители септических заболеваний уток, протекающих с похожими клинико-морфологическими проявлениями. Данный факт стоит принимать к вниманию при разработке новых иммунобиологических средств против инфекционных заболеваний птицы.

При бактериологическом исследовании сердца от свободноживущей перелетной водоплавающей птицы, было установлено наличие следующих видов бактерий: *Aerococcus viridans*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium casei*, *Brevundimonas diminuta*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter cancerogenus*, *Klebsiella mobilis*, *Macrococcus carouzelicus*, *Myroides odoratimimus*, *Pasteurella multocida*, *Pediococcus argentinicus*, *Proteus mirabilis*, *Riemerella anatipestifer*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus pasteurianus*, *Trueperella pyogenes*, *Vagococcus fluvialis*.

Как видно из полученных результатов, видовой спектр бактериальных агентов, выделенных из сердца свободноживущей водоплавающей птицы в различных регионах Российской Федерации, представлен 22 видами культивируемых бактерий.

Полная структура микрофлоры, определенная в рамках исследования сердца свободноживущей водоплавающей птицы (по семействам), отражена на рисунке №9.

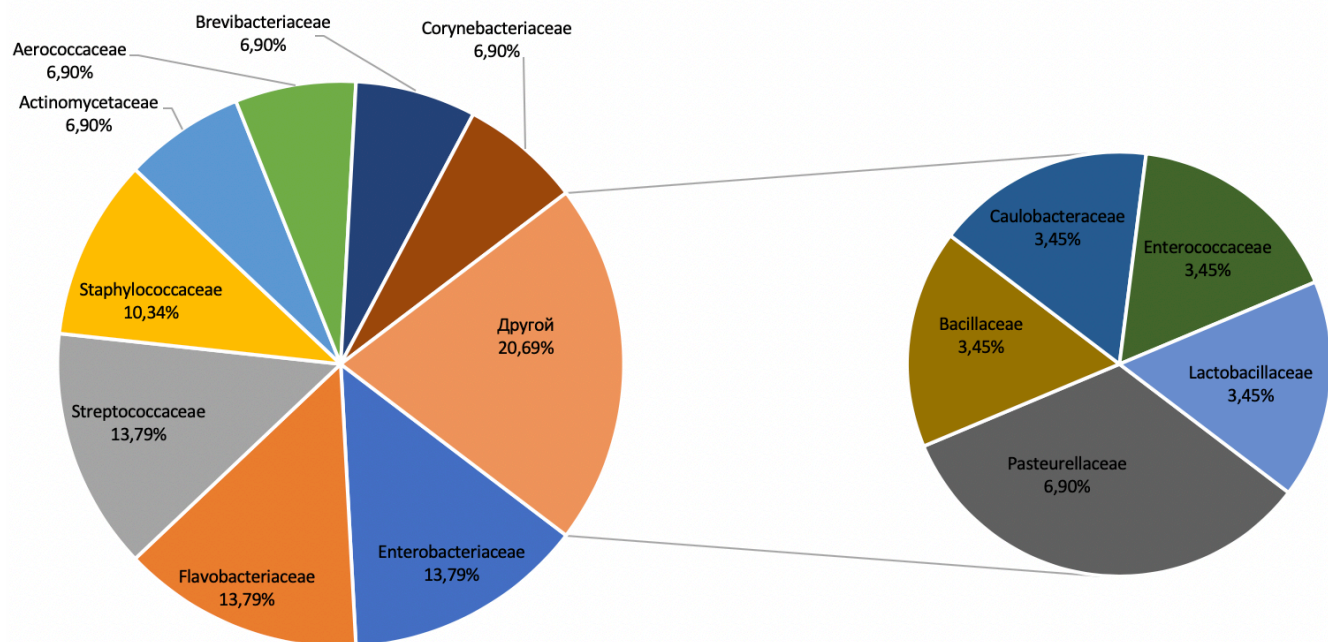


Рисунок 9 – Структура бактериальной микрофлоры, выделенной из сердца дикой (свободноживущей) водоплавающей птицы

Из представленных на рисунке № 9 данных, можно сделать следующие заключения: в структурном составе бактериальных агентов, выявленных в сердце свободноживущей водоплавающей птицы, преобладают бактерии семейств *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae* и *Streptococcaceae* – 13,79%; *Staphylococcaceae* – 10,34%; *Actinomycetaceae*, *Aerococcaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* и *Pasteurellaceae* – 6,90%; *Bacillaceae*, *Caulobacteraceae*, *Enterococcaceae* и *Lactobacillaceae* по 3,45% соответственно. Стоит обратить внимание на факт выявления возбудителя риермереллёза у перелетной птицы, что должно учитываться при формировании плана профилактических мероприятий на промышленных предприятиях, занятых разведением и откормом водоплавающих птиц.

Изоляты бактерий наиболее этиологически значимых видов сохранены в коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН в лиофилизированном виде с целью дальнейшего изучения.

Также стоит отметить, что в результате выполненной работы, можно проанализировать данные лишь о культивируемых видах бактерий. В связи с этим считать указанный бактериальный спектр организма птиц при септическом течении болезни полным, нельзя. Для полноценного раскрытия микробиома, необходимо использовать молекулярно-биологические методы, в частности метагеномный анализ.

4.3. Разработка схемы лабораторной диагностики риермереллёза

Поскольку в настоящее время риермереллёз не отнесен в РФ к особо опасным заболеваниям сельскохозяйственной и водоплавающей птицы, а также не включён в список отслеживаемых инфекционных патологий в рамках государственного эпизоотического мониторинга, то методические указания, регламентирующие проведение лабораторно-диагностических исследований на риермереллёз, отсутствуют. С целью компенсации сложившейся ситуации нами были

предприняты меры по разработке, апробации и внедрению данных методических указаний, что и было успешно реализовано.

Основными этапами проведения бактериологического исследования патологического и клинического материала были определены: получение и пересылка проб для бактериологического исследования; изготовление и микроскопирование мазков-отпечатков; посев на питательные среды; выделение чистой культуры микроорганизма; идентификация и дифференциация выделенных культур; постановка биопробы на лабораторных животных.

Основание для постановки положительного диагноза.

Предположительный диагноз на риимереллёз устанавливали на основании эпизоотических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений, которые фиксировали непосредственно на предприятии. Ввиду отсутствия в коммерческой реализации на территории России экспресс средств диагностики риимереллёза (ИФА, ПЦР), окончательный положительный диагноз нами мог быть установлен только при выделении чистой культуры *R. anatipestifer*, при обязательном наличии типичных клинических проявлений и патологоанатомических изменений у птицы. В случае выделения бактериальной культуры *R. anatipestifer* от птицы, но при отсутствии свойственных заболеванию поражений, диагноз установлен быть не может, так как многие изоляты не обладают патогенными свойствами.

Взятие проб материала и их транспортировка.

В качестве секционного материала для подтверждения носительства риимереллёза у взрослой птицы, при проведении вскрытия и патологоанатомического исследования трупов павших или вынужденно убитых особей отбирали: сердце, селезёнку, печень, лёгкие, яйцеводы. В случае необходимости проведения прижизненной диагностики инфекции, от птицы брали образцы крови. Было установлено, что получить наиболее достоверный результат можно лишь при проведении диагностических исследований секционного материала, так как бактериологическое исследование крови птицы (клинический материал) позволяет выделить возбудителя заболевания

исключительно в случаях септического процесса, т.е. преимущественно до 8-ми недельного возраста. У взрослой переболевшей птицы возбудитель в крови не выявляется.

При отборе образцов тканей и органов необходимым условием являлось хранение и транспортировка их в отдельных контейнерах, чтобы исключить возможность контаминации. Транспортировку полученных образцов с места непосредственного отбора в лабораторию производили не позднее 8 часов с момента взятия проб, с последующим транспортированием в охлаждённом виде – на льду. В случае, когда быстрое транспортирование было невозможно, нами допускалась возможность единократного замораживания материала.

Этапы выделения

Комплексное бактериологическое исследование предусматривало одновременное воспроизведение двух различных подходов к выявлению возбудителя риимереллёза:

- 1) микроскопирование мазков-отпечатков с целью выявления бактерий, морфологически сходных с *Riemerella spp.*;
- 2) посев материала на кровяной агар с целью выявления роста культур, схожих по ростовым свойствам с *Riemerella spp.*

Учитывая отсутствие разработанных методических указаний по диагностике исследуемого заболевания, нами был составлен и оптимизирован поэтапный процесс проведения бактериологического исследования, позволяющий максимально точно выявить и идентифицировать возбудитель инфекции.

С целью индикации *Riemerella spp.*, доставленные в лабораторию образцы материала осматривали для определения выраженности патологического процесса, после чего из различных органов и тканей птицы отбирали пробы для посева. В первый день исследования проводили посев патологического материала методом мазка-отпечатка. При этом исследуемую пробу органа или ткани удерживали пинцетом, обрабатывали 70 % раствором этилового спирта и

фламбировали в пламени горелки с целью снижения бактериальной обсемененности поверхности образца.

Стерильными ножницами образец ткани или органа разрезали пополам таким образом, чтобы на срезе была пораженная и здоровая ткань. Для каждого образца использовали новые стерильные инструменты, либо перед каждой манипуляцией их очищали от остатков материала, смачивали раствором 70% этилового спирта, и прожигали в пламени горелки.

Образец ткани удерживали пинцетом и несколько раз прикладывали свежим срезом к одной четверти поверхности кровяного агара в чашке Петри, после чего стерильной бактериологической петлей распределяли материал по методу Дригальского на оставшиеся три четверти поверхности питательной среды, что позволяет получить при дальнейшем культивировании единичные колонии бактерий.

Культивирование засеянных чашек с материалом проводили в термостате с температурным режимом 37 °С в течение 24-48 часов в CO₂ инкубаторе в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газ – не менее 5%.

Посев клинического материала (крови) проводили при выраженности септического процесса у птицы. Образцы крови высевали также на кровяной агар в объёме 0,2 мл по методу Дригальского, с последующим культивированием при 37 °С в течение 24-48 часов, в атмосфере с повешенным содержанием CO₂ -5%.

Еще одним обязательным критерием предварительной диагностики риимереллёза птицы является обнаружение возбудителя в мазках-отпечатках, приготовленных из проб патологического материала и крови. В качестве материала для приготовления фиксированных мазков-отпечатков мы использовали вторую часть образца, полученного при посеве на твердые питательные среды. Изготовление и окрашивание мазков-отпечатков проводили по общепринятым методикам. В мазках, окрашенных по методу Грама, бактерии *Riemerella spp.* выглядят как грамотрицательные палочки овоидной формы или кокко-палочки.

Поскольку *R. anatipestifer* относится к медленно растущим микроорганизмам, отбор культур, колонии которых схожи морфологически с искомым возбудителем, проводили на третий день исследования. Чашки Петри с посевами материала просматривали с целью выявления подозрительных колоний.

При обнаружении колоний микроорганизмов, характерных для *Riemerella spp.* (полупрозрачные, мукоидной консистенции, без выраженного пигмента) проводили их окрашивание и микроскопирование общепринятыми методами. В случае отсутствия роста типичных колоний, культивирование образцов продолжали ещё 24 часа в тех же условиях. В случае не возможности проведения микроскопирования и предварительной проверки свойств изолята, например, при наличии единичных колоний, проводили их отсев на кровяной агар бактериологической петлёй методом Дригальского. При обнаружении в мазках бактериальных клеток, имеющих морфологическое и культуральное сходство с *Riemerella spp.*, и при наличии достаточного количества материала, проводили изучение их оксидазной и каталазой активности. При получении положительных результатов оксидазного и каталазного тестов, а также микроскопии, культура признавалась подозреваемой на принадлежность к роду *Riemerella*. Подозрительные колонии отсевали на отдельные чашки с кровяным агаром для получения свежей чистой культуры. Культивирование посевов проводили в тех же условиях при температуре 37 °C в течение 24-48 часов в 5%-ной атмосфере углекислого газа.

На пятый день исследования, при наличии свежей чистой культуры 24 часового роста, проводили изучение биохимических свойств для родовой и видовой идентификации микроорганизма. Предварительно культуру окрашивали по методу Грама и вновь микроскопировали с целью подтверждения морфологии и исключения контаминации посторонней микрофлорой. В случае получения положительных результатов на культуральную и морфологическую схожесть бактерий с родом *Riemerella*, проводилось изучение их биохимических свойств для идентификации возбудителя рутинными методами или наборами экспресс идентификации. В случае использования рутинных сахаролитических тестов

результат учитывается через 24 и 48 часов культивирования с момента постановки тестов.

Через семь дней от начала исследования полученный изолят признавался *R. anatipestifer*, если культура оксидаза - и каталаза положительная; образуемые на кровяном агаре колонии не имеют пигмента; разжижает желатин; не вызывает гидролиз эскулина; обладает α - галактозидазой, α - мальтозидазой, валинариламидазой; не обладает β - глюкозидазой и аргининдекарбоксилазой. Реакция Фогес-Проскауэра, CAMP-тест, уреазы, образование индола, эстеразы, ферментация глюкозы, трегалозы, мальтозы, фруктозы, маннозы и декстрина являются переменным свойством и могут зависеть от изолята.

С целью подтверждения видовой принадлежности культуры *Riemerella spp.* также целесообразно использовать метод «MALDI-ToF» или секвенирование участка гена 16S rRNA.

В случае подтверждения принадлежности выделенной культуры к виду *R. anatipestifer* проводили биологическую пробу с использованием 10-ти дневных утят. Заражали восприимчивых птиц путем внутримышечного введения бактериальной суспензии в объёме 0,5 см³ с концентрацией 3 млрд. м. к./см³, используя не менее трех утят на каждую культуру *R. anatipestifer*. Продолжительность наблюдения за утятами составляла 10 дней или до момента их гибели. Изолят признается патогенным в случае гибели всех утят опытной группы.

На основании анализа полученных результатов бактериологического исследования материала была разработана схема проведения диагностических исследований на риимереллёз (рисунок №10).



Рисунок 10 - Схема проведения бактериологического исследования клинического и патологического материала для подтверждения диагноза риереллёз

Разработанная нами схема индикации возбудителя риерелллёза с использованием ростообеспечивающих питательных сред и четкого выполнения схемы исследования, позволила выделить и идентифицировать 88 изолятов риерелл. Поскольку часть изолятов были получены из одних и тех же предприятий, но из разных комплексов и/или разных проб материала, нами они признавались одним штаммом. Таким образом, было отобрано 9 штаммов *R. anatipestifer* и 2 штамма *R. columbina*, выявленных в разных предприятиях и регионах страны.

4.4. Эпизоотологические данные по риерелллёзу

На территории Российской Федерации риерелллёз водоплавающей птицы не контролируется на постоянной основе в рамках государственного эпизоотического мониторинга, ввиду чего официальных статистических данных о неблагополучии отдельных территориях по данной инфекции не существует.

Такую ситуацию в первую очередь стоит ассоциировать с отсутствием случаев передачи возбудителя от птицы людям, а также с низкой осведомлённостью практикующих ветеринарных специалистов о данной патологии. Ветеринарные врачи предприятия, столкнувшись с риимереллёзом, затрудняются ставить диагноз на основании клинико-морфологических проявлений. Это дополнительно осложняется отсутствием единой методики проведения лабораторных исследований, т.е. лаборатории не могут выявить возбудителя в клиническом или секционном материале, так как не имеют методических указаний, регламентирующих проведение работы.

При выполнении настоящей научной работы нам удалось установить наличие возбудителя *R. anatipestifer* в ряде регионов Российской Федерации. На графическом рисунке №11 отмечены регионы страны, где нами было подтверждено циркулирование *R. anatipestifer* в птицеводческих предприятиях, занятых разведением гусей и уток.

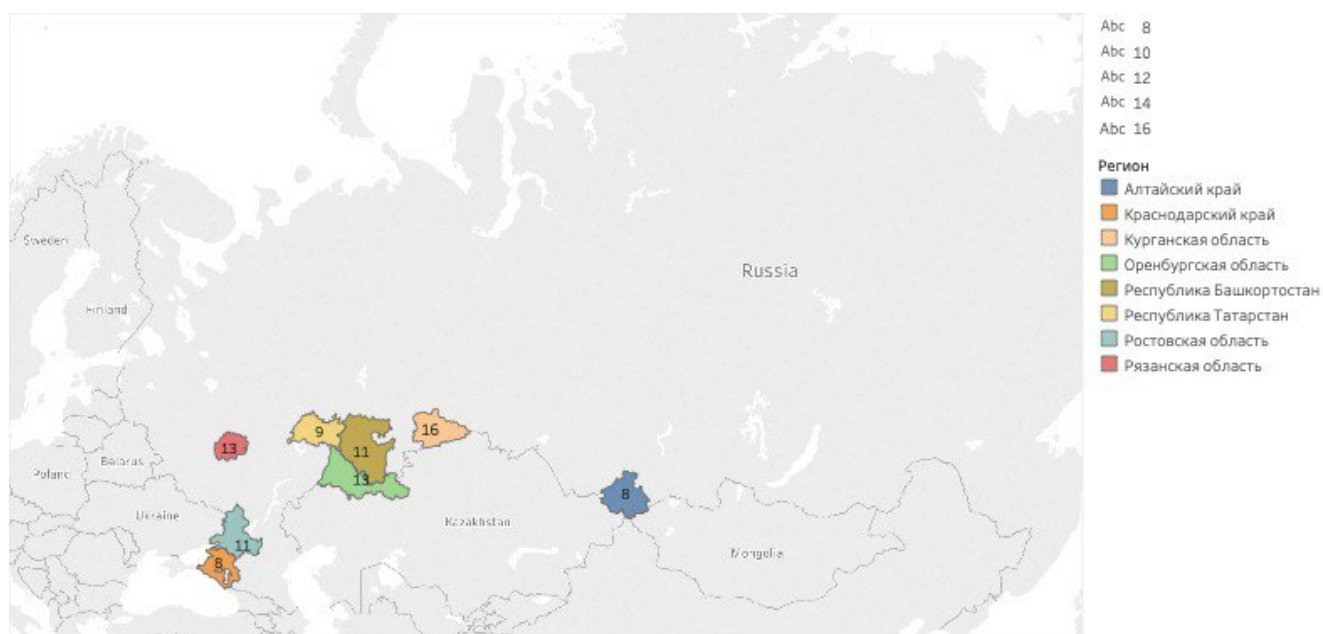


Рисунок 11 — Регионы России, на птицеводческих предприятиях которых выявлено циркулирование *Riemerella anatipestifer*

Как видно из рисунка №11, изоляты риимерелл были выделены нами из материала восьми птицеводческих предприятий различных регионов: штамм №478 выделен в Оренбургской области, штамм №490 – в Ростовской области,

штамм №512 в Алтайском крае, штамм №513 в Краснодарском крае, штамм №549 в Рязанской области, штамм №566 в республике Башкортостан, штамм №571 в республике Татарстан, штамм №602 в Курганской области. Штамм №617 выделен от свободноживущей водоплавающей птицы, отстреленной в республике Башкортостан. Полученные нами результаты исследований в определенной степени подтверждаются данными ФГБУ «ВНИИЗЖ», сотрудниками которого выявлено наличие возбудителя риимереллёза на птицеводческом предприятии Ростовской области [4].

При выполнении работы было установлено, что для риимереллёза свойственна сезонность, что обусловлено сезоном яйцекладки у водоплавающих птиц. На предприятиях, где сезон яйцекладки начинался в феврале-марте, с началом первых выводов, фиксируются случаи массового падежа молодняка. Наиболее подвержены инфекции утята и гусята в возрасте до 40 дней, массовой гибели среди птицы старшего возраста не зафиксировано. Заболеваемость птицы колеблется в диапазоне 50-70%, смертность молодняка составляет 10,5-67,5%, но она может контролироваться антибиотиками широкого спектра действия. Более точных данных по заболеваемости и смертности среди восприимчивого поголовья птицы получить не удалось, так как предприятия, опасаясь массового отхода птицы, используют превентивное лечение и профилактику клинически здорового поголовья в преддверии начала развития инфекции (матафилактика).

Факт выделения культуры *R. anatipestifer* от перелетной птицы свидетельствует о возможном участии её в распространении рассматриваемой патологии по территории РФ и иных стран.

4.5. Характеристика изолятов *Riemerella anatipestifer*

При выполнении диссертационной работы было выделено 88 изолятов бактерий рода *Riemerella*. Из общего количества изолятов после изучения фенотипических свойств нами были отобраны девять штаммов *R. anatipestifer*, в том числе один штамм от дикой птицы. Полученные культуры *R. anatipestifer* на плотных питательных средах с добавлением 5% дефибринированной крови при

культивировании в CO₂ инкубаторе в атмосфере 5% углекислого газа и температуре 37 °С через 24-36 часов образовывали мелкие колонии S-формы, не имеющих пигмента и гемолиза. Через 48 часов культивирования, на кровяных средах можно наблюдать два варианта роста культур риимерелл. Первый из которых - это отдельные мукоидные колонии размером от 2 до 5 мм (рисунок №12), второй вариант роста бактерий выглядит как сплошной газон (рисунок №13).



Рисунок 12 - Колонии *Riemerella anatipestifer* на кровяном агаре через 48 ч культивирования



Рисунок 13 - Сплошной рост *Riemerella anatipestifer* на кровяном агаре через 48 ч культивирования

При первичном выделении культур риимерелл, уже на первые сутки культивирования может наблюдаться рост мелких колоний возбудителя, размер которых в среднем составляет 0,5-1,0 мм. На вторые сутки они увеличиваются до 3-5 мм или могут сливаться, образуя сплошной газон. Ни в одном из случаев, как при первичном выделении, так и при последующих пересевах, выделенные нами культуры риимерелл не обладали гемолитической активностью при культивировании на кровяном агаре с добавлением крови барана.

Рост культуры риимерелл на средах (МПА, триптон-соевый агар), не содержащих дефибрированную кровь барана, наблюдался через 48-72 часа и был существенно скуднее. При попытках культивирования возбудителя на агарах МакКонки, Симмонса, Эндо, SS – агаре (сальмонелла-шигелла агаре), Сабуро положительный результат получить не удавалось. При посеве в столбик полужидкого агара и культивировании в описанных ранее условиях, через 48 ч термостатирования наблюдается незначительный рост культуры вдоль укола.

При культивировании бактерий вида *R. anatipestifer* на бульонных питательных средах, а именно на мясопептонном-бульоне, эугоник бульоне, бульоне Хоттингера, получить накопление клеток не удалось ввиду того, что изучаемый агент плохо или вообще не растёт на них даже при длительном культивировании. Наиболее подходящей для роста *Riemerella spp.* бульонной средой является сердечно-мозговой бульон, который обеспечивал накопление бактериальных клеток в концентрации $\sim 2 \cdot 10^9$ м.к./см³ при культивировании в присутствии углекислого газа через 56-72 часа. А также положительный результат культивирования риимерелл мы смогли зафиксировать на триптиказо-соевой среде с декстрозой, использование которой позволило нам получить накопление бактериальных клеток до $2,5 \cdot 10^9$ м.к./см³ через 24 часа после посева при выращивании на шейкере.

При микроскопировании культур *R. anatipestifer*, окрашенных по методу Грама, выявлялись грамотрицательные кокко-палочки, не образующие капсулу и спор, расположенные в мазках одиночно, парно или в виде небольших цепочек (рисунок №14).

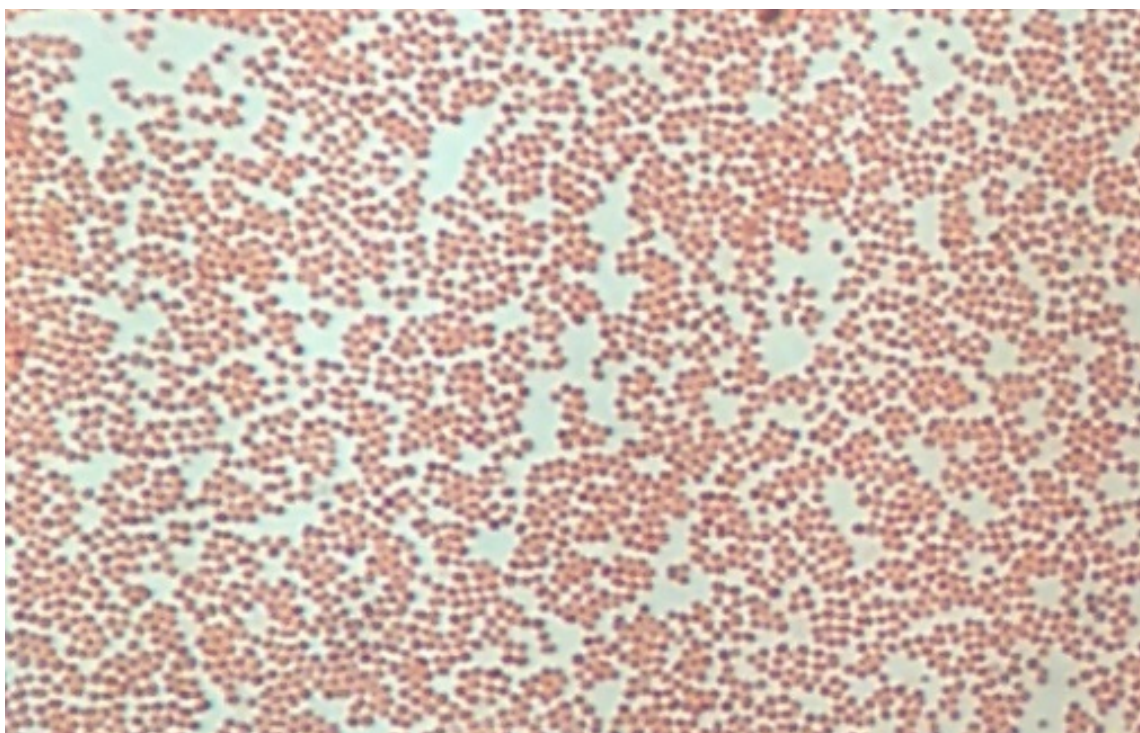


Рисунок 14 – Морфология бактерий *Riemerella anatipestifer*, выращенных на кровяном агаре (окрашивание по методу Грама)

Как видно из рисунка 14, клетки *R. anatipestifer* имеют схожие морфологические и тинкториальные свойства с бактериями рода *Pasteurella* и *Moraxella*, что объясняет их раннюю классификацию как *Pasteurella anatipestifer* и *Moraxella anatipestifer*.

Биохимический профиль выделенных изолятов риимерелл был изучен путем определения протеолитических и сахаролитических свойств культур. Результаты представлены в таблице №2.

Таблица 2 – Биохимические свойства штаммов риимерелл, выделенных от водоплавающей птицы в различных регионах Российской Федерации

№№	Показатель	478	490	512	513	549	566	571	602	617
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Пигмент на кровяном агаре	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Разжижение желатина	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	-	+	-
7	САМР тест	-	-	-	+	-	-	-	-	+
8	Уреаза	+	+	-	+	+	-	+	-	+
9	Образование индола	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	Аргининдекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	β- Глюкозидаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	α- Галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	α- Мальтозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Эстераза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Валин ариламидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Трипсин	-	-	+	-	-	-	-	-	-
17	α-Химотрипсин	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ферментация углеводов										
18	Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Трегалоза	-	-	-	-	-	-	-	+	-
20	Мальтоза	+	+	+	-	+	+	+	+	+
21	Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	Манноза	+	-	+	+	+	+	+	+	+
23	Декстрин	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Как видно из данных, представленных в таблице №2, все изоляты риимерелл имели типичные свойства, но отличались между собой в реакции Фогес-Проскауэра, САМР тесте, уреазе, индоле, трипсине, α-химотрипсине, а также возможности ферментации трегалозы, мальтозы и маннозы.

4.6. Антибиотикорезистентность штаммов *Riemerella anatipestifer*

Для определения оптимальной антибактериальной терапии риимереллёза обязательным условием является определение чувствительности культур

риимерелл к антибиотикам различных групп. В рамках настоящей научной работы нами была изучена чувствительность изолятов *R. anatipestifer* к различным антимикробным препаратам и составлена антибиотикограмма, отраженная на графическом рисунке №15.

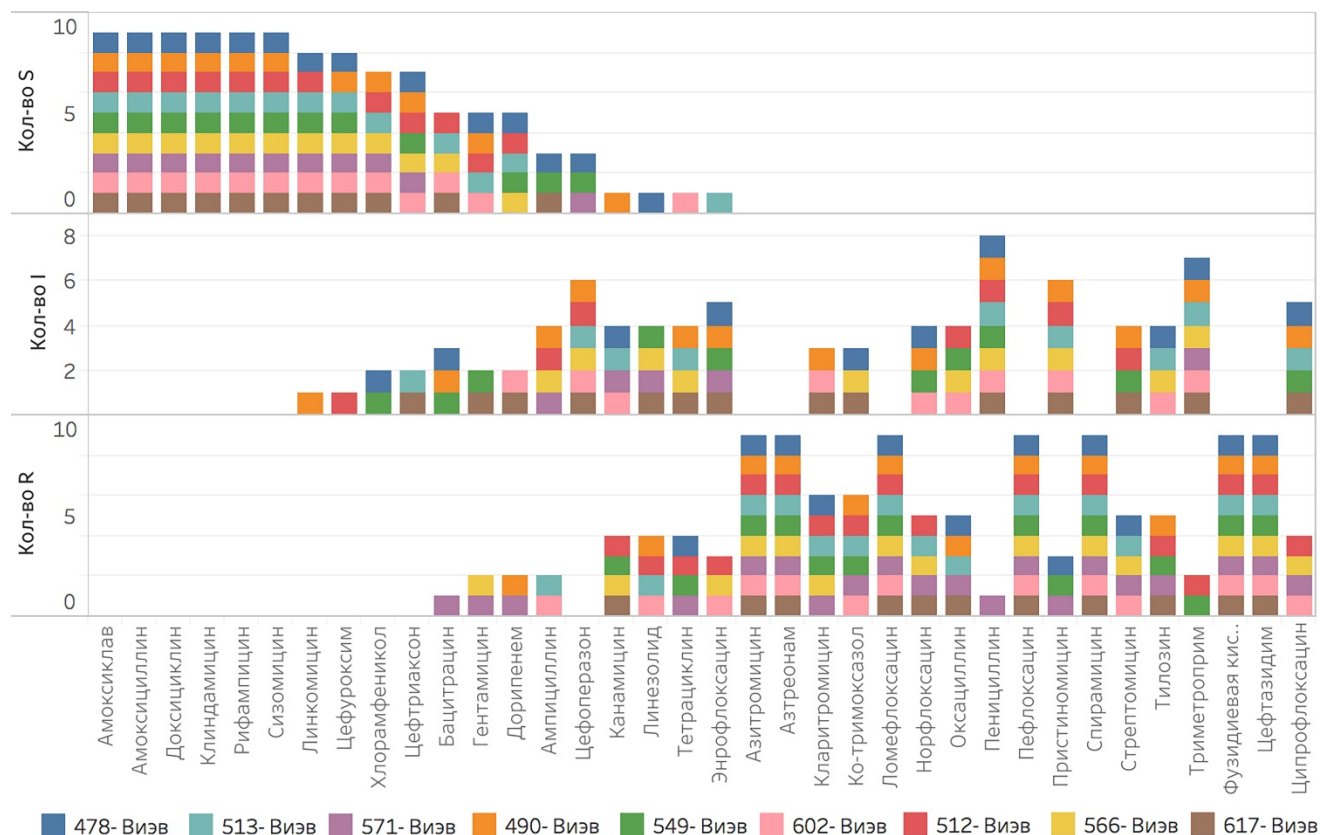


Рисунок 15 – Антибиотикограмма культур *Riemerella anatipestifer*

Как видно из представленных на рисунке № 15 данных, штаммы риимерелл имеют различную степень чувствительность к антибиотикам группы аминогликозидов. Установлено, что к канамицину и стрептомицину, относящимся к аминогликозидам 1-ого поколения, подавляющее количество культур резистентны или проявляют промежуточную чувствительность. При этом гентамицин, относящийся к аминогликозидам 2-ого поколения, и сизомицин (3-е поколение), продемонстрировали положительный эффект, ингибируя 56% и 100% культур риимерелл соответственно.

Амфениколы, представленные хлорамфениколом, были эффективны в отношении 78% изолятов риимерелл, а 22% культур имели промежуточную чувствительность к данному АБП.

Рифампицин, относящийся к ансамицинам, демонстрировал 100%-ную эффективность в отношении всех культур.

Синтетические антибиотики, представленные ко-тримоксазолом и триметропримом, не обладали высокой эффективностью в отношении большинства изолятов, при этом 67 % и 22% культур были резистентны, а также 33 и 78% штаммов имели промежуточную чувствительность к данным антимикробным препаратам, соответственно.

Из антибиотиков тетрациклинового ряда в 100% случаев наблюдалась высокая чувствительность штаммов к доксициклину, при этом к тетрациклину были чувствительны лишь 11% культур.

Макролиды, представленные азитромицином, кларитромицином, эритромицином, спирамицином, тилозином, ни в одном из случаев не были активны в отношении исследуемых штаммов возбудителя.

Клиндамицин и линкомицин, группы линкозамидов, продемонстрировали высокую степень антибактериальной эффективности в отношении *R. anatipestifer*, ингибируя рост 100 и 89% культур соответственно.

Монобактамы, представленные азтреонамом, в 100 % случаев были неэффективными.

Линезолид, принадлежащий к оксазолидинонам, был активен лишь в отношении одного штамма *риемерелл*, что составляло 11%.

Дорипенем оказался эффективен в отношении 56% культур *риемерелл*, в 22% случаев была зафиксирована промежуточная чувствительность.

Штаммы *риемерелл* имели 100%-ную резистентность к фузидиевой кислоте.

Бацитрацин проявил эффективность в отношении 56% культур, в то время как 33% имели промежуточную чувствительность, а 11% были резистентны.

Среди полусинтетических пенициллинов 100%-ную эффективность в отношении испытуемых культур *риемерелл* имели амоксиклав и амоксициллин, при том, что ампициллин был активен в отношении 33% культур, оксациллин неэффективен в 56% случаев и 44% случаях имел промежуточную эффективность. Пенициллин, относящийся к природным пенициллинам, не

продемонстрировал высокую эффективность, но в 89% случаях была определена промежуточная чувствительность.

Фторхинолоны 2 и 3-го поколения оказались малоэффективными, так к ломефлоксацину и пефлоксацину в 100% случаях была установлена резистентность. Норфлоксацин и ципрофлоксацин в 56 и 44% случаях соответственно имели промежуточную чувствительность, при полной резистентности оставшихся культур. К энрофлоксацину чувствительны оказалось лишь 11% штаммов.

Среди цефалоспоринов 2 и 3 – го поколения наибольшая эффективность наблюдалась у цефуроксима, цефтриаксона и цефоперазона, которые ингибировали 89, 78 и 33% культур, при этом к цефтазидиму 100% штаммов были резистентны.

Проведенное исследование позволило установить наиболее эффективные антибактериальные средства, которые могут быть использованы при ликвидации вспышек инфекции в птицеводческих предприятиях на территории РФ. Наибольшей эффективностью в отношении циркулирующих изолятов *Riemerella* обладают: сизомицин, рифампицин, клиндамицин, амоксиклав, амоксициллин, доксициклин, линкомицин, цефуроксим, хлорамфеникол, цефтриаксон, что позволяет рекомендовать данные антибиотики для лечения *риемереллёза* в промышленных условиях [102].

4.7. Патогенные и вирулентные свойства изолятов *Riemerella anatipestifer*

Определение патогенных свойств штаммов имеет важное значение для установления этиологической роли конкретного бактериального агента в возникновении вспышки заболевания. Для этой цели нами проведены эксперименты по заражению белых мышей массой 16-18 гр, выбранных в качестве биологической модели. В процессе исследований отработано несколько способов заражения мышей имеющимися культурами *риемерелл*, при этом культуры вводили подкожно, внутримышечно и внутрибрюшинно. Концентрация вводимой белым мышам бактериальной суспензии составляла $3 \cdot 10^9$ м.к./см³,

объём вводимой суспензии был равен 0,5 см³, то есть заражающая доза составляла 1,5 млрд. м. к. риимерелл. Всего было использовано 64 белых мыши, в том числе 10 контрольных, которым для чистоты эксперимента вводился стерильный физиологический раствор в аналогичном объёме. Критерием оценки патогенности культур риимерелл являлась гибель всех зараженных животных, а также обязательное выделение инфицирующей культуры из паренхиматозных органов подопытных мышей. Период наблюдения за мышами составлял 14 дней, или до момента их гибели.

Во время реализации настоящего исследования было установлено, что ни один из способов инфицирования белых мышей оказался не пригодным для определения патогенности имеющихся культур, так как мы не зафиксировали гибели всех лабораторных животных в группе. Однако при внутрибрюшинном способе заражения мышей культурами №512, №566 и №602 отдельные особи мышей погибли на 7, 5 и 11 день соответственно. Проведенное патологоанатомическое исследование павших животных показало отсутствие у мышей характерных для риимереллэза патологоанатомических изменений внутренних органов. В ходе проведения бактериологического исследования патологического материала от мышей, нам удалось выделить лишь одну культуру из трёх, а именно *R. anatipestifer* №512, из крови сердца. Выделить два остальные изолята от мышей не удалось. Полученные результаты позволяют утверждать, что исследуемые штаммы риимерелл не обладают патогенностью для белых мышей, поэтому использовать данный вид животных при проведении биопробы нецелесообразно. Контрольные мыши, не подвергавшиеся заражению, оставались живы и не проявляли каких-либо клинических форм заболевания.

Для второго эксперимента по определению патогенности штаммов риимерелл использовали 10-ти дневных мускусных утят. Инфицирование проводили путём внутримышечного введения суспензии бактериальных культур с концентрацией $3 \cdot 10^9$ м. к./см³ в объёме 0,5 см³, т.е. инфицирующая доза составила $1,5 \cdot 10^9$ м.к. Всего в опыте использовано 28 утят, из которых 10 птенцов были контрольными, которым вместо заражающей культуры внутримышечно вводили

стерильный физиологический раствор в объёме 0,5 см³. Выбор внутримышечного способа инфицирования обусловлен имеющимися в зарубежных литературных источниках сведениями, свидетельствующими о положительном эффекте данного способа. Период наблюдения за подопытными птенцами составлял 14 дней и/или до момента их гибели. Критерием оценки патогенности культур риимерелл была гибель всех зараженных утят, а также обязательное выделение инфицирующей культуры из органов подопытных птенцов. Контрольные утята, не подвергавшиеся заражению, оставались живы и не проявляли каких-либо клинических форм инфекционного процесса.

Результаты исследования показали, что все штаммы риимерелл вызвали гибель утят в течение 24-96 часов с момента заражения. Основными клиническими признаками болезни после инфицирования были обильные истечения из глаз и носа, диарея, нарушение координации, западание глаз. При вскрытии трупов в грудной полости выявлены фибринозный перикардит и эпикардит, признаки острого интерстициального отёка лёгких и серозно-фибринозный плеврит. Со стороны брюшной полости - увеличение печени и селезёнки. При проведении бактериологического исследования крови из сердца утят, заражающие культуры *R. anatipestifer* были выделены от всех использованных птиц, что свидетельствовало о септическом характере заболевания. Помимо септического процесса у утят, зараженных штаммами №566 и №490, воспроизведена нервная форма болезни. Она проявлялась нарушением координации движений, плавательными движениями конечностей, птенцы, при этом, находились в спинном положении, что говорит о поражении центральной нервной системы.

Установление факта патогенности культур риимерелл для 10-ти дневных утят, позволило перейти к следующему этапу - опыту по оценке вирулентности культур, выраженной в показателе LD₅₀. С этой целью также заражали 10-ти дневных утят, которым внутримышечно вводили суспензию бактериальных клеток с десятикратной разницей концентрации, продолжительность наблюдения

составляла 14 дней. Результаты определения вирулентности приведены в таблице №3.

Таблица 3 – Величина LD₅₀ штаммов *Riemerella anatipestifer* для 10-ти дневных мускусных утят при внутримышечном способе заражения

Штамм	Инфицирующая доза, м. к. *	Количество зараженных животных, гол. N=144	Погибло, гол.	LD ₅₀ м. к.
478	1,27*10 ⁹	4	4	1,77*10 ⁸
	1,27*10 ⁸	4	1	
	1,27*10 ⁷	4	0	
	1,27*10 ⁶	4	0	
490	1,53*10 ⁹	4	4	8,25*10 ⁷
	1,53*10 ⁸	4	2	
	1,53*10 ⁷	4	1	
	1,53*10 ⁶	4	0	
512	1,61*10 ⁹	4	4	1,61*10 ⁸
	1,61*10 ⁸	4	2	
	1,61*10 ⁷	4	0	
	1,61*10 ⁶	4	0	
513	1,49*10 ⁹	4	3	4,95*10 ⁸
	1,49*10 ⁸	4	1	
	1,49*10 ⁷	4	0	
	1,49*10 ⁶	4	0	
549	1,55*10 ⁹	4	4	2,20*10 ⁷
	1,55*10 ⁸	4	4	
	1,55*10 ⁷	4	1	
	1,55*10 ⁶	4	0	
566	1,68*10 ⁹	4	4	5,31*10 ⁷
	1,68*10 ⁸	4	3	
	1,68*10 ⁷	4	1	
	1,68*10 ⁶	4	0	
571	1,74*10 ⁹	4	4	1,74*10 ⁸
	1,74*10 ⁸	4	2	
	1,74*10 ⁷	4	0	
	1,74*10 ⁶	4	0	
602	1,38*10 ⁹	4	2	1,08*10 ⁹
	1,38*10 ⁸	4	1	
	1,38*10 ⁷	4	0	
	1,38*10 ⁶	4	0	
617	1,42*10 ⁹	4	4	1,99*10 ⁸
	1,42*10 ⁸	4	1	
	1,42*10 ⁷	4	0	
	1,42*10 ⁶	4	0	

* Значения инфицирующих доз 1,27, 1,53, 1,61, 1,49, 1,55, 1,68, 1,74, 1,38 и 1,42 млрд. м. к. были установлены путем определения КОЕ культур *R. anatipestifer* в инфицирующей суспензии по методу Коха.

Определение значения LD₅₀ проводили с использованием пробит-анализа, реализованного при помощи программного обеспечения BioStat 2009. Проведение патологоанатомического вскрытия павшей птицы позволило нам зафиксировать изменения во внутренних органах и тканях свойственные для риимереллэза. Выжившие в ходе опыта по определению вирулентности утят были подвергнуты эвтаназии с целью отбора материала и проведения микробиологического исследования. При этом у них, как и у павшей птицы, были зафиксированы поражения, свойственные для риимереллэза в начальной форме.

Анализ данных, представленных в таблице №3, позволяет утверждать, что штаммы *R. anatipestifer* №549, №566 и №490 являются наиболее вирулентными, значение LD₅₀ для них составляет $2,20 \cdot 10^7$, $5,31 \cdot 10^7$, $8,25 \cdot 10^7$ м.к., соответственно. В дальнейшем, для разработки инаktivированного препарата против риимереллэза, использовались именно эти культуры, как обладающие наиболее выраженными факторами вирулентности, что должно способствовать формированию напряженного иммунитета у вакцинированных птиц. Также культуры могут быть использованы как контрольные штаммы при отработке методов контроля и оценке качества иммунобиологических лекарственных средств. Остальные штаммы, при достаточном уровне антигенности и иммуногенности, также могут быть пригодными для разработки и изготовления вакцинного препарата.

4.8. Изучение антигенных свойств штаммов риимерелл

Получив гомологичные сыворотки для каждого штамма риимерелл, нам удалось определить антигенное родство имеющихся девяти культур. Для реализации данной задачи, возникла необходимость получения монопрепаратов (вакцин) из каждого штамма, ввиду чего нами параллельно проводилась работа по определению оптимальных условий культивирования, позволяющих с минимальными экономическими затратами получить максимальный выход конечной продукции – бактерины, используемого для определения антигенных и иммуногенных свойств штаммов [54].

Изготовление экспериментальных серий препаратов проведено в следующей последовательности:

Получение бактериальной массы.

В связи с трудностью культивирования штаммов *R. anatipestifer* на общепринятых питательных бульонах, используемых в биопроизводстве (МПА, бульон Хоттингера, триптон-соевый бульон), для накопления бактериальной массы применяли поверхностный метод культивирования на кровяном агаре, а также глубинный метод, с использованием триптиказо-соевого бульона с декстрозой. Порядок поверхностного культивирования риимерелл был следующим: в первый день проводили подготовку генерации штамма путём ресуспендирования содержимого лиофилизированной культуры в пробирке с последующим посевом на кровяной агар; культивирование продолжалось в течение 48 часов в атмосфере 5% CO₂ и температуре 37 °С. На третий день культивирования, в случае соответствия роста культур по морфологическим и тинкториальным свойствам *R. anatipestifer*, а также отсутствия роста посторонней микрофлоры, бактериальную массу смывали стерильным физиологическим раствором в объёме 15 мл. В этот же день полученная суспензия бактериальных клеток засеивалась на ранее подготовленные культуральные матрасы с кровяным агаром, площадью 225 см². Объём засевной (маточной) бактериальной суспензии на каждый матрас составлял по 5 мл. Матрасы культивировали в CO₂ – инкубаторе в течение 48 часов, после чего бактериальную массу смывали физиологическим раствором в объёме 50 мл. Полученная суспензия контролировалась на отсутствие контаминации посторонней микрофлорой, тинкториальные свойства и концентрацию. Таким образом было получено по 50 см³ суспензии бактериальных клеток каждого штамма с концентрацией 40-60 млрд. м.к./см³.

Приведённый способ культивирования риимерелл хорошо подходит для получения маленьких экспериментальных серий препарата для проведения доклинических испытаний, но является достаточно трудоёмким и требует большего количества времени по сравнению с глубинным методом при

промышленном производстве. Для повышения экономической эффективности биопроизводства нами были апробированы для культивирования риимерелл различные бульонные питательные среды, в результате чего было установлено, что единственной средой, обеспечивающей накопление данного микроорганизма, является триптиказо-соевый бульон с декстрозой. Для подтверждения этого факта проведено несколько опытов по глубинному культивированию. В первом случае мы использовали культивирование в бутылках, помешивающихся на шейкере в CO₂ инкубаторе при 5% углекислого газа с температурным режимом 37 °С. Подготовка матровой расплодки была выполнена согласно вышеописанной методике. Данный способ культивирования на 2-ые сутки позволил добиться накопления 3,9 млрд. м.к./см³. Второй метод подразумевал использование биореактора New Brunswick BioFlo/CelliGen 115, что позволяло автоматически контролировать обогащение среды кислородом, поддержание pH и подкормки глюкозой. Культивирование в ферментере позволило достичь накопления 6,6 млрд. м.к./см³ через 18 ч культивирования в триптиказо-соевом бульоне с декстрозой.

Инактивация и концентрирование.

Инактивацию полученных культур *R. anatipestifer* проводили путём добавления 0,3 % формалина к общему объёму. Продолжительность инактивации составляла 14 дней при температуре +21 °С. Концентрировали культуры центрифугированием при 3 тыс об/мин в течении 30 мин.

Компоновка моновакцин.

С целью изучения антигенности и иммуногенности исследуемых штаммов, нами были изготовлены девять моновакцин из имеющихся штаммов, где в качестве адъюванта использовали гидроокись алюминия. Выбор данного адъюванта был случайный, так как выполняя данный этап работы мы были ориентированы на выбор наиболее антигенных культур. Концентрация антигена в вакцинах составляла 3 млрд. м.к./см³, способ введения - внутримышечно двукратно с интервалом 14-16 дней. Объём каждого биопрепарата составлял минимум 400 доз (200 мл).

Для проведения исследования было сформировано 9 опытных и 1 контрольная группа мускусных утят 10-ти дневного возраста, по 6 голов в каждой. Вся используемая в опыте птица была подобрана по принципу аналогов. Каждую группу птиц подвергали двукратной иммунизации моновакцинами с интервалом 14 дней. Объем вводимой суспензии составлял 0,5 см³.

Для оценки антигенности вводимых препаратов от подопытных птиц отбирали образцы крови, при этом пробы брали перед первой вакцинацией, перед ревакцинацией и через 14-16 дней после повторного введения. Определение титра антител проводили в реакции агглютинации на стекле с использованием двухсуточной культуры риимерелл и сыворотки крови, полученной от опытных и контрольных утят. Для постановки реакции агглютинации использовали гомологичные штаммы. Результаты исследования приведены в таблице №4.

Таблица 4 – Антигенная активность штаммов риимерелл

Штамм	Номер птицы	Титр антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови утят				
		До вакцинации	После первой вакцинации	После второй вакцинации	Среднее значение титра антител после второй вакцинации (стандартное отклонение)	Среднее значение титра антител после второй вакцинации (среднеквадратичное отклонение)
1	2	3	4	5	6	7
478	1	0	1:40	1:160	133,33±41,31	133,33±37,71
	2	0	1:80	1:80		
	3	0	1:40	1:80		
	4	0	1:80	1:160		
	5	1:5	1:40	1:160		
	6	0	1:80	1:160		
490	7	0	1:40	1:80	120,00±43,81	120,00±40,00
	8	0	1:80	1:160		
	9	0	1:40	1:160		
	10	0	1:20	1:80		
	11	0	1:80	1:160		
	12	0	1:80	1:80		
512	13	0	1:80	1:320	173,33±117,75	173,33±107,49
	14	0	1:80	1:160		
	15	0	1:40	1:80		

	16	0	1:40	1:80		
	17	0	1:40	1:320		
	18	0	1:40	1:80		
513	19	0	1:40	1:80	160,00±87,63	160,00±80,00
	20	0	1:40	1:160		
	21	0	1:40	1:80		
	22	0	1:40	1:160		
	23	0	1:80	1:160		
	24	0	1:40	1:320		
	25	0	1:160	1:160		
549	26	0	1:80	1:80	120,00±43,81	120,00±40,00
	27	0	1:40	1:160		
	28	0	1:40	1:80		
	29	0	1:80	1:160		
	30	0	1:80	1:80		
	31	0	1:80	1:160		
566	32	0	1:80	1:160	133,33±41,31	133,33±37,71
	33	0	1:40	1:80		
	34	0	1:40	1:160		
	35	0	1:80	1:160		
	36	0	1:80	1:80		
	37	0	1:40	1:80		
571	38	0	1:40	1:80	93,33±32,65	93,33±29,81
	39	0	1:80	1:160		
	40	0	1:40	1:80		
	41	0	1:80	1:80		
	42	0	1:40	1:80		
	43	0	1:80	1:160		
602	44	0	1:40	1:80	146,67±93,52	146,67±85,37
	45	0	1:80	1:320		
	46	0	1:40	1:80		
	47	0	1:80	1:160		
	48	0	1:40	1:80		
	49	1:5	1:40	1:80		
617	50	0	1:80	1:160	120,00±43,81	120,00±40,00
	51	0	1:40	1:80		
	52	0	1:40	1:160		
	53	0	1:40	1:80		
	54	0	1:80	1:160		
	55	0	0	0		
Контроль	56	0	0	0	0	0
	57	0	0	0		
	58	0	0	0		
	59	0	0	0		
	60	0	0	0		

Как видно из данных таблицы №4, все штаммы риимерелл обладают антигенной активностью, находящейся в диапазоне значения от 1:93 - 1:173. У

птицы контрольной группы, которой вводили физиологический раствор, антитела не были обнаружены. Предполагается, что при изменении технологии изготовления антигенов для вакцинации, например концентрации, замене адъюванта или внесении в состав иммуномодуляторов, антигенность риимерелл может быть выше, но в настоящей работе мы не ставили перед собой такой задачи.

Стоит отметить, что некоторые птицы на начальном этапе опыта, т.е. до вакцинации, уже имели минимальный уровень антител к риимереллам, что выявлено в реакции агглютинации. Это явление можно объяснить низкой специфичностью серологической реакции, или тем, что утята получили антитела к возбудителю риимереллёза овариальным путём от родителей.

Поскольку, согласно литературным данным, в настоящее время насчитывается 21 серотип *R. anatipestifer*, а в свободной реализации на территории РФ нет коммерческих диагностических наборов серотипизации риимерелл, для оценки антигенного разнообразия возбудителя, мы дополнительно изучили антигенность в перекрёстной реакции агглютинации. Для этого реакцию агглютинацию ставили не только с гомологичными культурами, но и гетерологичными. Результаты данной работы приведены в таблице №5.

Таблица 5 – Перекрёстная антигенная активность штаммов риимерелл в реакции агглютинации (среднее значение по 5 образцам)

Штаммы	Сыворотка крови								
	478	490	512	513	549	566	571	602	617
478	1:104	1:120	1:128	-	-	1:160	-	-	1:144
490	1:144	1:160	1:120	-	-	1:106	-	-	1:112
512	1:128	1:144	1:96	-	-	1:104	-	-	1:160
513	-	-	-	1:144	-	-	1:128	-	-
549	-	-	-	-	1:160	-	-	1:112	-
566	1:152	1:80	1:112	-	-	1:133	-	-	1:128
571	-	-	-	1:112	-	-	1:96	-	-
602	-	-	-	-	1:128	-	-	1:144	-
617	1:112	1:128	1:136	-	-	1:136	-	-	1:112

Полученные результаты опыта, отражённые в таблице №5, позволяют сделать вывод, что в обследованных птицеводческих предприятиях циркулирует как минимум три серотипа *R. anatipestifer*, не обладающих перекрёстной

антигенной активностью. Так, штаммы №478, №490, №512, №566 и №617 относятся к одному серотипу, №513 и №571 ко второму, №549 и №602 к третьему. Данное серотиповое разнообразие необходимо учитывать в последующей работе по созданию средств специфической профилактики риимереллёза водоплавающих птиц в Российской Федерации.

4.9. Определение иммуногенных свойств *Riemerella anatipestifer*

С целью изучения иммуногенности моновакцин, изготовленных из имеющихся штаммов риимерелл, нами было проведено заражение ранее иммунизированных утят гомологичными и гетерологичными штаммами риимерелл в дозе 5 LD₅₀. Поскольку в предыдущем опыте все 9 штаммов были разделены на 3 различные серологические группы, не обладавшие перекрёстной антигенной активностью, то для определения иммуногенности нами были использованы парные варианты: штамм для моновакцины - заражающий штамм. Так, моновакцина из штамма №549 – заражение №602; моновакцина из №566 – заражение №490; моновакцина из №571 – заражение №513.

Заражение проводили на 15 день после повторной вакцинации и отбора образцов крови для серологических исследований. Концентрация инфицирующей дозы каждого штамма составляла для №602 - $5,4 \cdot 10^9$, №490 - $4,12 \cdot 10^8$, №513 - $2,47 \cdot 10^9$ м.к. В качестве контрольных использовались мускусные утята аналогичного возраста, по 2 головы на каждый заражающий штамм. Результаты опыта приведены в таблице №6.

Таблица 6 – Иммуногенность штаммов риимерелл при заражении гомологичными и гетерологичными штаммами

Вакцинация вакциной	Номер птиц (согласно 4 таблице)	Заражающая культура		
		602	490	513
		Выживаемость утят после заражения		
549	№ 25-26	2 из 2	-	-
	№ 27-28	-	0 из 2	-
	№ 29-30	-	-	0 из 2
566	№ 31-32	0 из 2	-	-
	№ 33-34	-	2 из 2	-
	№ 35-36	-	-	0 из 2
571	№ 37-38	0 из 2	-	-
	№ 39-40	-	0 из 2	-
	№ 41-42	-	-	2 из 2
Контрольные утята:		0 из 2	0 из 2	0 из 2

«-» - не определялось

Проведённый опыт позволил доказать возможность специфической профилактики риимереллёза, поскольку вакцинированная птица выжила в остром опыте после заражения штаммами в дозе 5LD₅₀. Все контрольные утята погибли после заражения. Кроме того, результаты опыта наглядно подтверждают, что различные серотипы риимерелл не обладают перекрёстной антигенностью, ввиду чего иммуногенная активность вакцин против данного заболевания наблюдается лишь в отношении гомологичных серотипов, включенных в состав препарата. Результаты опыта позволяют предположить, что минимальный защитный уровень антител при риимереллёзе должен быть не менее 1:106, что видно при сравнении результатов таблицы №5 и №6. Данное значение титра антител получено при определении перекрестной антигенной активности с использованием сывороток крови птиц, вакцинированных препаратом из штамма №566 с штаммом №490.

4.10. Депонирование штамма *Riemerella anatipestifer*

Штамм *R. anatipestifer* №566 был депонирован в государственной коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, как пригодный для использования в качестве производственно-контрольной культуры, под регистрационным номером В-1251 от 11 июня 2018 года, с целью разработки коммерческого биопрепарата против риимереллёза [приложение 3].

После официального депонирования штамма, был разработан стандарт организации СТО 00496165-0006-2018 – «Производственные и контрольные

штаммы *Riemerella anatipestifer* (метод изготовления и контроля посевных материалов)», используемый потенциально для внедрения в производство [приложение 4].

Нуклеотидная последовательность штамма *R. anatipestifer* № 566 размещена в базе GenBank под названием VIEV_MKB_Duck_689-VIEV 16S ribosomal RNA gene (MK965879.1).

4.11. Клинические испытания экспериментальной серии вакцины на птицеводческом предприятии

Клинические испытания проводились в соответствии с Федеральным законом "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ на птицеводческом предприятии республики Башкортостан. В период с 28.02.2018 г. по 29.06.2018 г. проведено исследование безопасности, активности и эффективности применения «Вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ», экспериментальной серии №3, дата выпуска 02.2018 г., срок годности до 02.2019 г. [приложение №8].

Для проведения исследований (безвредность вакцины в рекомендованной дозе при однократном и двукратном введении, безвредность введения вакцины в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, антигенная активность, эффективность применения вакцины на восприимчивых видах птиц) были сформированы несколько групп птиц - аналогов, содержание и кормление которых было идентичным. Схема опыта отражена в таблице №7.

Таблица 7 - Клинические испытания вакцины против риемереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ» на утках

Опытная группа (голов)	Контрольная группа (голов)	Возраст при первой вакцинации (дней)	Возраст при второй вакцинации (дней)	Доза первого введения см ³	Доза второго введения см ³	Серьёзные последствия применения
Безвредность при однократном применении вакцины в рекомендованной дозе						
100	10	110	-	1	-	Отсутствуют
Безвредность при двукратном применении в рекомендованной дозе						
100	10	110	125	1	1	Отсутствуют
Безвредность при однократном применении в двукратной дозе						
50	10	110	-	2	-	Отсутствуют
Влияние препарата на сохранность молодняка, полученного от вакцинированной птицы						
250	250	150	165	1	1	Отсутствуют

4.11.1. Определение безвредности использования препарата в рекомендованной дозе при однократном применении для родительского поголовья птицы

Для проведения опыта было сформировано две группы уток породы «Агидель» в возрастной категории 110 дней. В опытную группу было отобрано 100 уток, в контрольную - 10.

Вакцину уткам вводили внутримышечно в область бедра в объёме 1 см³. Для соблюдения «чистоты эксперимента» всем контрольным птицам был введён стерильный физиологический раствор по аналогичной схеме. Выполнение всех манипуляций проводили в соответствии с необходимой степенью стерильности, то есть с предварительной обработкой места инъектирования и использования стерильных шприцов с иглами.

Длительность наблюдения за вакцинированными птицами составила 14 дней, в течение которых проводился их клинический осмотр и термометрия. При выполнении опыта было установлено, что введение вакцины «РеймерДак-ВИЭВ» и физиологического раствора в дозе 1 см³ уткам в возрасте 110 дней, принадлежащих ООО «Племптицезавод Благоварский», не вызывало у птиц опытной группы значительного повышения температуры тела, показатели которой оставалась в пределах физиологической нормы.

Отмечено отсутствие каких-либо системных нежелательных последствий введения препарата: у птиц не наблюдалось признаков угнетения, снижения аппетита, адинамии. Из местных реакций было отмечено развитие непродолжительной хромоты, которая проходила самостоятельно спустя 24-48 часов после вакцинации.

У птиц контрольной группы не наблюдалось повышения температуры, а также местных или системных изменений физиологических параметров организма после введения физиологического раствора.

Таким образом, проведённый опыт показал, что применение вакцины «РеймерДак-ВИЭВ» безопасно для птиц в возрастной категории 110 дней при введении в рекомендованной дозе 1 см³. У птиц не зафиксировано каких-либо системных изменений физиологического состояния организма. Из местных реакций было зафиксировано развитие хромоты, которая самостоятельно и без каких-либо последствий проходила через 24-48 часов после введения препарата.

4.11.2. Безвредность препарата в рекомендованной дозе при двукратном введении для родительского поголовья птицы

Опыт по изучению безвредности и ареактогенности экспериментальной серии №3 «Вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ» при двукратном введении был проведён с использованием тех же групп птиц, что были сформированы для первого опыта. Промежуток между первой и второй вакцинацией составил 14 дней. Объём дозы (1 см³) и способ введения препарата были аналогичными. В ходе выполнения работы не зафиксировано случаев гибели птицы. Изменение температуры тела после введения препарата не выходило за пределы физиологической нормы.

При повторном введении препарата «РеймерДак-ВИЭВ» в рекомендованной дозе также было установлено, что у птиц опытной группы кратковременно повышается температура, но значение показателя оставалось в пределах физиологической нормы. В течение 24-ёх часов после инъекции температура тела птицы вернулась к первоначальным значениям.

Комиссией отмечено отсутствие каких-либо системных нежелательных последствий на введение препарата: у птицы не отмечено признаков угнетения, снижения аппетита, адинамии. При пальпации места инъекции вакцины не было отмечено образования отеков и гиперемии кожи. Развитие хромоты при повторном введении препарата не наблюдалось. За весь период наблюдения не обнаружено образования на месте инъекций у подопытных птиц долго не рассасывающихся уплотнений и абсцессов.

Проведённый опыт показал, что применение вакцины «РеймерДак-ВИЭВ» безопасно для птиц в возрастной категории 124 дня при двукратном введении в рекомендованной дозе – 1 см³: у птиц не зафиксированы какие-либо местные или системные изменения физиологического состояния организма.

4.11.3. Безвредность препарата в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, для родительского поголовья птицы

Для проведения опыта было сформировано две группы птиц-аналогов: опытная группа из 50 голов уток и контрольная группа из 10 уток, в возрасте 110 дней. Вакцина была введена птицам опытной группы внутримышечно в область бедра в объёме 2 см³, после предварительной обработки места инъекции. Птице контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор в дозе 2 см³. Оценка безопасности препарата проводилась аналогично ранее описанному принципу. Контроль над птицей продолжался в течение 14 дней после вакцинации с ежедневной термометрией.

Установлено, что введение препарата «РеймерДак-ВИЭВ» в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, вызывало у птиц опытной группы кратковременное повышение температуры, значение которого не превышало нормативные значения. Через 24 часа после инъекции температура тела птицы вернулась к первоначальным параметрам.

Отмечено отсутствие каких-либо системных нежелательных последствий на введение препарата: у птицы не наблюдалось признаков угнетения, снижения аппетита, адинамии. При пальпации места инъекции отмечено образование отека и

гиперемия кожи, которые сохранялись у птицы в течение 3 – 4 дней. После инъекции препарата у птицы наблюдалась кратковременная хромота, самостоятельно проходящая в течении 2-3 дней. Отек на месте инъекции вакцины исчезал самостоятельно без каких-либо дополнительных воздействий, при введении физиологического раствора отека и гиперемии не наблюдалось. За весь период наблюдения не обнаружено образования у подопытных птиц долго не рассасывающихся уплотнений на месте инъекций и абсцессов.

У птиц контрольной группы не наблюдалось повышения температуры, и местных или системных изменений физиологических параметров организма после введения физиологического раствора.

Проведённый опыт показал, что применение вакцины «РеймерДак-ВИЭВ» безопасно для птиц родительского поголовья при введении в дозе, двукратно превышающей рекомендованную - 2 см³: у птиц не зафиксированы какие-либо системные изменения физиологического состояния организма. Из местных реакций после инъекции препарата было отмечено развитие хромоты, которая самостоятельно проходящая в течение 2-3 дней.

4.11.4. Изучение влияния препарата на сохранность молодняка, полученного от вакцинированного родительского поголовья птицы

В условиях предприятия было сформировано две группы уток по 250 голов в каждой, в возрасте 150 дней. Птица контрольной группы не подвергалась иммунизации, но для чистоты эксперимента им был введён стерильный физиологический раствор способом и дозой соответствующим опытной группе.

Птицам опытной группы №1 препарат вводился в соответствии со схемой вакцинации двукратно в дозе 1 см³. Контроль за птицей устанавливался в течение 3 месяцев, в том числе во время периода яйцекладки. Критерием оценки являлось отсутствие у вакцинированных птиц снижения сохранности, а также отсутствие у молодняка, полученного от вакцинированных птиц, каких-либо врождённых уродств.

Среди птиц опытной группы после первого введения препарата не отмечалось каких-либо выраженных признаков патологий. Пальпацией было обнаружено образование небольшой отёчности в области инъекции с повышением местной температуры и незначительной болезненности. Отёк самостоятельно рассасывался в течение 3 суток, нормализация температуры проходила в течение 24 часов. У части подопытных птиц после первичной вакцинации наблюдалось развитие хромоты, которая прекращалась через 2-3 дня без каких-либо дополнительных вмешательств. Повторное введение препарата для первой группы было проведено через 14 день после первичной вакцинации. После инъекции наблюдалась кратковременная отёчность на месте инъекции и повышением местной температуры. У птицы контрольной группы после введения стерильного физиологического раствора не фиксировалось проявление системных и местных реакций.

Результаты контроля сохранности молодняка полученного от первой опытной группы составило 96,32%, сохранность молодняка, полученного от птицы контрольной группы, составила 93,76%.

Проведённый опыт показал, что применение вакцины «РеймерДак-ВИЭВ» безопасно для родительского поголовья птицы при однократном и двукратном введении. Вакцинация способствовала повышению сохранности молодняка, полученного от вакцинированной птицы, в сравнении с молодняком от не иммунизированных уток. Случаев появления птенцов с врожденными аномалиями развития не зафиксировано.

4.11.5. Определение антигенной активности препарата при использовании его в рекомендованной дозе при двукратном введении

Оценку антигенной активности вакцины «РеймерДак-ВИЭВ», серии №3 проводили путем постановки серологических реакций с определением титра антител в сыворотке крови вакцинированных птиц к антигену *R. anatipestifer* в реакции агглютинации.

Получение сыворотки крови проводили выборочно от 10 голов птиц первой и второй опытной группы, в динамике, т.е. перед первой иммунизацией, перед второй вакцинацией и через 14 дней после второй вакцинации. Результаты исследования приведены в таблице №8.

Таблица 8 – Антигенная активность вакцины «РеймерДак-ВИЭВ».

Группа опытная №1											
Номер птицы	Титры антител с оценкой два креста и выше в сыворотке крови										Среднее
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
До вакцинации	1:20	1:20	1:10	1:10	1:20	1:5	1:20	1:10	1:20	1:20	1:15
После первой вакцинации	1:80	1:80	1:40	1:80	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:68
После второй вакцинации	1:160	1:160	1:80	1:160	1:160	1:160	1:320	1:80	1:160	1:160	1:160
Группа опытная №2											
Номер птицы	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-
До вакцинации	1:10	1:20	1:20	1:10	1:20	1:10	1:20	1:20	1:20	1:20	1:17
После первой вакцинации	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80
После второй вакцинации	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320	1:160	1:160	1:192

Как видно из данных таблицы №8, титры антител к возбудителю риимереллёза первой и второй опытных групп, двукратно вакцинированных разработанным биопрепаратом, существенно возрастали через 14 дней после второй вакцинации в сравнении со значением аналогичного показателя до начала опыта. Увеличение однократной дозы до 2 см³ для второй опытной группы, вместо рекомендуемой дозировки 1 см³ для первой опытной группы, не привело к статистически достоверной разнице в полученных значениях титра антител. Таким образом можно утверждать, что оптимальная эффективная доза должна составлять 3 млрд. м.к. в объеме 1 см³, что позволяет получить средний титр антител после второй вакцинации 1:160.

Применение вакцины «РеймерДак-ВИЭВ» вызывает у вакцинированных птиц образование антител через 14 дней после второй вакцинации, при этом среднее значение составляет 1:160 с оценкой на два креста и выше, что превышает защитный уровень антител, определенный ранее – 1:106.

Как видно из представленных результатов опыта, «Вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ», экспериментальная серия №3, изготовленная ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, является безопасным, иммуногенным и эффективным иммунобиологическим препаратом, обладающим необходимой протективной эффективностью при использовании в неблагополучных по риимереллёзу хозяйствах, и может быть рекомендована для практического использования.

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Риемереллёз в Российской Федерации не включен в список заболеваний сельскохозяйственной птицы, и не контролируется в рамках государственного эпизоотологического мониторинга. Это увеличивает риск распространения заболевания, способного привести к значительным экономическим потерям, связанным с высокой смертностью молодняка, достигающей до 70 %, и высокими затратами на лечебно-оздоровительные мероприятия. Учитывая опасность риемереллёза для водоплавающих птиц, в ряде иностранных государств в целях предотвращения ущерба с успехом применяют различные моно- и ассоциированные препараты. В России же отсутствуют зарегистрированные иммунобиологические средства для профилактики риемереллёза птиц. В связи с этим, изучение эпизоотологической ситуации по риемереллёзу в России, изучение случаев выявляемости и серотипового разнообразия возбудителя, разработка методических указаний по диагностике и профилактике риемереллёза, а также разработка эффективного средства специфической профилактики, являются приоритетными задачами для профильных ветеринарных структур.

Для выполнения перечисленных задач ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН с 2016 года ведёт активную работу, позволяющую качественно влиять на снижение рисков распространения инфекционных болезней сельскохозяйственных животных и птиц, связанных с возникновением и распространением новых, ранее незарегистрированных инфекционных патологий. Кроме того, актуальность задачи по разработке иммунобиологического средства против риемереллёза подчеркивается отсутствием в России не только отечественных разработок, но иностранных препаратов. Ранее присутствовавшие в РФ препараты иностранной компании «Biovac» - Вирсин 424, Вирсин 424а, Вирсин 570 и Вирсин 765, в состав которых входит *R. anatipestifer*, с апреля 2017 года сняты с регистрации и не могут быть использованы для профилактики болезни. Важность разработки биопрепарата для водоплавающей птицы, включающего в антигенный состав *R. anatipestifer*, подчеркивают специалисты ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Поскольку в отечественной литературе отсутствуют полноценные сведения о таком заболевании как риимереллёз, то прежде, чем приступить к изготовлению и испытаниям экспериментальной вакцины против данной инфекции, было необходимо получить объективные данные по распространенности, изучить и проанализировать все аспекты развития данной патологии, начиная от характеристики возбудителя, заканчивая клинико-морфологическим проявлением и профилактикой.

Риимереллёз является заразной болезнью уток, гусей, индеек и реже других видов домашней и дикой птицы, протекающая с острым или хроническим сепсисом, фибринозным перикардитом, перигепатитом, аэросаккулитом, казеозным сальпингитом и менингитом. Ввиду большого разнообразия форм инфекции, на практике заболевание зачастую диагностируется не корректно, в частности устанавливаются такие диагнозы как пастереллез, эшерихиоз, сальмонеллез, хламидиоз, аспергиллез. Проблемы постановки окончательного диагноза обуславливаются отсутствием методических подходов и принципов по лабораторной диагностике риимереллёза.

Возбудителем инфекции является *Riemerella anatipestifer*, которая ранее называлась *Pfeifferella anatipestifer*, *Pasteurella anatipestifer* и *Moraxella anatipestifer*. Микроорганизм представляет собой неподвижную, не спорообразующую грамотрицательную палочку или коккопалочку, растущую на питательных средах с добавлением 5-10% дефибринированной крови животных. На агаре МакКонки рост бактерий отсутствует. *R. anatipestifer* не образует пигмент на средах с дефибринированной кровью, не вызывают гидролиз эскулина, обладают возможностью разжижения желатина, α-галактозидазой, α-мальтозидазой, валин-ариламидазой, не обладают β-глюкозидазой и аргининдекарбоксилазой. Реакция Фогес-Проскауэра, CAMP тест, уреазы, образование индола, эстеразы, ферментация трегалозы, глюкозы, мальтозы, фруктозы, маннозы и декстрина являются переменным свойством и зависят от изолята. Рассматриваемый возбудитель по антигенной структуре состоит из 21 серотипа, которые не обладают перекрестной антигенной активностью, что в

свою очередь осложняет разработку высокоэффективного иммунобиологического средства для специфической профилактики.

При создании вакцины целесообразно учитывать не только антигенное разнообразие возбудителя, но и выраженность факторов вирулентности, так как они усиливают иммунный ответ и улучшают качество препарата. Так, первым и наиболее важным фактором вирулентности стоит считать липополисахариды, которые являются мощным стимулятором формирования иммунного ответа.

Анализ литературных данных свидетельствует, что риемереллёз чаще возникает при наличии предрасполагающих факторов, которые можно разделить на четыре категории, а именно: первичные вирусные инфекции, паразитарные заболевания, механические стресс факторы (терапевтические и профилактические манипуляции) и нарушении зоогигиенических условий содержания птицы. На основании этого стоит отметить, что для предотвращения вспышек инфекции, указанные факторы должны быть устранены или минимизированы. Кроме того, при профилактике и предотвращении рисков развития инфекции необходимо прерывать и/или контролировать все возможные пути передачи возбудителя, а именно контактный, аэрогенный, алиментарный.

Характерным признаком возникновения вспышки инфекции являются сопутствующие клинико-морфологические проявления, сопровождающиеся высокой смертностью птицы в возрасте 3-4 недель. При возникновении инфекции в стаде выявляются птицы с респираторной формой болезни, сопровождающейся глазными и носовыми истечениями гнойного характера (казеозный или фибринозный синусит), кашлем и/или чиханием; желудочно-кишечная форма характеризуется диареей, при этом фекалии имеют зеленоватый оттенок. Как правило, эти две формы являются первыми признаками развития заболевания, ввиду чего выявление в стаде таких птиц может служить основанием для начала антибактериальной терапии, что сдерживает массовый отход птицы.

Нервная форма заболевания проявляется среди более взрослой птицы и сопровождается частичной или полной потерей координации, произвольными движениями, тремором головы и шеи, параличами, судорогами, искривлением

шеи, опистотонусом, плавательными движениями конечностей в спинном положении; септическая форма проявлялась бактериемией, сильным угнетением, апатией.

При проведении патологоанатомического исследования павшей и вынужденно убитой птицы, преобладающими признаками являются уплотнение кожных покровов со стороны спины с развитием гиперкератоза, алопеции и некротический дерматит; отёк подкожной клетчатки с наличием студенистого инфильтрата в области грудной стенки; хронический артрит, иногда протекающий с эрозией суставного хряща; наиболее часто встречающиеся изменения в органах брюшной полости сопровождаются признаками застойной гиперемии печени с явлениями белковой (зернистой) или жировой дистрофии; катаральным воспалением слизистой оболочки кишечника с инъецированием сосудов и кровоизлияниями; в грудной полости чаще всего фиксировали фибринозный перикардит и эпикардит, дряблость сердечной мышцы с явлениями дистрофии, с отложением фибрина; признаки острого интерстициального отёка лёгких, серозную пневмонию, серозно-фибринозный плеврит, фибринозную бронхопневмонию, фибринозный трахеит, фибринозный аэросаккулит; казеозный или фибринозный сальпингит.

При проведении лабораторных диагностических исследований с целью подтверждения факта циркуляции возбудителя риимереллёза и получения полевых изолятов, нами было попутно выделено большое количество бактериальных агентов, имеющих различную этиологическую значимость. Таким образом, нам удалось не только впервые подтвердить циркулирование возбудителя риимереллёза на территории птицеводческих предприятий различных регионов РФ, но и определить спектр бактериальных агентов, возможно участвующих в развитии сочетанных инфекций.

В ходе выполнения исследований была разработана схема лабораторной диагностики риимереллёза: обоснована методика отбора и хранения образцов материала для диагностических исследований, наиболее подходящие для выделения возбудителя. При этом выявление культур из сердца и легких

свидетельствует о септическом проявлении инфекции. Выделение возбудителя из печени и яйцеводов было значительно реже, чем из сердца и легких, что можно объяснить наличием большого разнообразия бактериальных агентов в печени и яйцеводах, менее требовательными к ростовым свойствам питательной среды.

Полученные данные позволяют утверждать, что для диагностики риимереллёза целесообразнее исследовать органы систем кровообращения и дыхания (кровь, сердце, трахею, легкие), что позволит с наибольшей достоверностью поставить корректный диагноз.

Комплекс бактериологического исследования предусматривает:

1) Микроскопирование мазков отпечатков на наличие характерных для бактерий рода *Riemerella* морфологических свойств. Данная процедура хотя и относительная и не является средством постановки окончательного диагноза, но позволяет выявлять наиболее пораженные ткани и органы животных, что повышает вероятность обнаружения возбудителя. Изготовление, окрашивание, и микроскопирование мазков отпечатков происходит одновременно с посевом материала на агаризированные питательные среды методом посева-отпечатка.

2) Посев методом отпечатка на кровяной агар позволяет за короткий период (24-48 часов) обнаружить колонии, характерные для *Riemerella spp.* Микроскопирование полученных колоний позволяет определить морфологию бактериальной культуры. Следующим этапом является биохимическая идентификация культуры. Использование бульонного накопления возбудителя не всегда приводит к положительному результату, поскольку *R. anatipestifer* плохо и/или вообще не растёт на жидких питательных средах.

Полученные в ходе проведения настоящей диссертационной работы результаты, касаемые принципов лабораторной диагностики риимереллёза, легли в основу методических указаний «Диагностика риимереллёза водоплавающих птиц», утверждённые РАН 20.03.2019 г. Разработанная документация предназначена для специалистов, работающих в системе ветеринарных лечебно-профилактических организаций, независимо от их организационно-правовой

формы и формы собственности, в том числе структуре Россельхознадзора, и направлена на улучшение эпизоотического состояния в стране.

При обследовании 12 утководческих и гусеводческих предприятий различных регионов, нами было впервые в Российской Федерации подтверждено циркулирование возбудителя риимереллёза и выделено 8 изолятов *R. anatipestifer*, что составляет 66,7 % от количества обследованных хозяйств. Неблагополучными по риимереллёзу регионами стоит считать Курганскую, Оренбургскую, Ростовскую, Рязанскую области, республики Татарстан и Башкортостан, Алтайский и Краснодарский края.

Выделенные при проведении эпизоотического мониторинга культуры *R. anatipestifer* обладали типичными для вида морфологическими, культуральными, тинкториальными, биохимическими свойствами.

При определении антибиотикорезистентности выделенных изолятов риимерелл было установлено, что наибольшей эффективностью обладают сизомицин, рифампицин, клиндамицин, амоксиклав, амоксициллин, доксициклин, линкомицин, цефуроксим, хлорамфеникол, цефтриаксон. Полученные нами результаты несколько отличаются от имеющихся в литературе данных зарубежных исследователей. В частности, в работе Zhong C.Y. с соавторами отмечено, что культуры риимерелл наиболее чувствительны к пенициллину, цефтиофуру, цефалотину, хлорамфениколу, фламехину и канамицину [105]. В работе Sun N. и др. сообщается о чувствительности к энрофлоксацину, хлорамфениколу, линкомицину, стрептомицину, неомицину, и устойчивости к пенициллину G, ампициллину, тетрациклину, триметроприму/сульфаметоксазолу, канамицину и гентамицину [95]. Такие различия в полученных результатах являются вполне ожидаемыми, поскольку производители сельхозпродукции в разных странах используют свои, утвержденные схемы применения антибактериальных препаратов, следовательно, и развитие антибиотикорезистентности может не совпадать.

При изучении патогенных свойств культур риимерелл установлено, что белые мыши не могут являться лабораторной моделью для воспроизведения

инфекции, поскольку ни один из способов инфицирования белых мышей не позволил получить объективных данных о патогенности культур. Гибель используемых в опыте лабораторных животных не зафиксирована. Однако, учитывая, что используемые для заражения изоляты риимерелл были получены при вспышках заболевания с ярко выраженными клинико-морфологическими симптомами болезни и массовой гибелью птицы, штаммы должны были обладать патогенностью, что и было подтверждено в опытах на утках. Поэтому дальнейшее определение патогенных свойств нами проводилось с использованием птиц естественно-восприимчивых видов.

В ходе выполнения этого этапа исследования, было подтверждено, что после заражения утят штаммом №549 гибель наступала в течении 48 часов наблюдения. От штаммов №512 и №617 гибель наступила в течении 24-72 часов, от культур №478, №490, №566, №571 в течении 48-72 часов, а от №513 и №602 в течении 48-96 часов соответственно. Такие различия сроков наступления гибели птенцов после заражения могут быть связаны с выраженностью факторов патогенности (генов патогенности) и/или различной серовариантной принадлежностью. Данная теория ранее описана в работе авторского коллектива Zhou, Z. и др., где речь идет о том, что из 48 генов в геноме *R. anatipestifer*, восемь относятся к наиболее опасным факторам вирулентности. Это позволяет объяснить, почему среди культур риимерелл встречаются вирулентные, слабовирулентные и не вирулентные [106].

Для оценки возможности эффективной вакцинации птиц против риимереллёза, нами были изготовлены экспериментальные серии препаратов из каждого выделенного штамма. Всего получено девять моновакцин, где в качестве адьюванта использовали гель гидроокиси алюминия. Выбор адьюванта был случайный, так как выполняя данный этап работы мы ориентировались на отбор наиболее антигенных культур при равных условиях исследования. Концентрация антигена в вакцинах составляла 3 млрд. м.к./см³, способ введения - внутримышечный двукратно с интервалом 14 дней. Полученные моновакцины использованы в опыте по определению антигенных свойств риимерелл. Опыт был

построен таким образом, чтобы оценить титр антител после вакцинации птицы, а также определить количество серотипов *R. anatipestifer*, циркулирующих на территории птицеводческих предприятий России. Полученные результаты опыта позволили нам сделать вывод, что на территории РФ, а именно в обследованных нами птицеводческих предприятиях, циркулирует как минимум три серотипа *R. anatipestifer*, не обладающих перекрёстной активностью. Определить конкретную серотиповую принадлежность не представлялось возможным, так как в свободной реализации на территории РФ нет коммерческих диагностикумов для серотипизации риимерелл.

Следующим этапом проведена паспортизация и депонирование культур риимерелл в государственной коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. После депонирования производственного штамма, был разработан стандарт организации СТО 00496165-0006-2018 – Производственные и контрольные штаммы *Riemerella anatipestifer* (метод изготовления и контроля посевных материалов).

Финальным этапом выполнения диссертационной работы стало определение безвредности, антигенной активности и эффективности применения вакцины на восприимчивых видах птиц в промышленных условиях предприятия в Республике Башкортостан.

В ходе реализации данного опыта установлено, что экспериментальная вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ», изготовленная ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, является безопасным, высоко иммуногенным и эффективным иммунобиологическим препаратом, обладающим необходимой протективной эффективностью при использовании в неблагополучных по риимереллёзу птицеводческих хозяйствах, и может быть рекомендована для практического использования. Средний титр антител после двукратной вакцинации птицы составил 1:160-1:192, в то время как титр до вакцинации не превышали значение 1:15.

Таким образом, вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ», изготовленная из выявленных на территории страны штаммов *R. anatipestifer*, при двукратной вакцинации

способна защитить птицу от заражения летальными дозами возбудителя, что говорит о высокой протективной эффективности разработанного иммунобиологического средства и о возможном внедрении его в ветеринарную практику.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возбудителем риимереллёза водоплавающих птиц является бактерия вида *Riemerella anatipestifer*. К риимереллёзу наиболее восприимчив молодняк уток и гусей в возрасте 14-40 дней, при этом заболеваемость может достигать 70%, а смертность - 10,5-67,5%. Клинически болезнь проявляется обильными выделениями из глаз и носовых отверстий, затрудненным дыханием, диареей, нервными явлениями (нарушение координации движений, искривление шеи, тремор головы, судороги, параличи, спинное положение с плавательными движениями конечностей). Основными патолого-анатомическими признаками риимереллёза у водоплавающих птиц являются: некротический дерматит, уплотнением кожи с развитием алопеции; отек подкожной клетчатки с образованием студенистого инфильтрата; хронический артрит с эрозией суставного хряща; гнойный синовит; застойная гиперемия печени с явлениями белковой (зернистой) дистрофии; отек и очаговые некрозы селезенки; катаральное воспаление слизистой желудка и кишечника с инъецированием сосудов; фибринозный перикардит; трахеит и аэросаккулит; интерстициальный отек легких; фибринозная бронхопневмония; казеозный или фибринозный сальпингит у взрослой птицы.

В ходе выполнения работы были отработаны методические подходы по выделению и идентификации возбудителя риимереллёза водоплавающих птиц. На основании результатов проведенных исследований предложена схема лабораторной диагностики риимереллёза. Используя данную схему, в период 2016-2019 гг., мы смогли идентифицировать 88 изолятов риимерелл, из которых было отобрано 9 штаммов *R. anatipestifer* и 2 штамма *R. columbina*, полученных из разных предприятий и регионов страны. Штаммы риимерелл были выделены из материала восьми птицеводческих предприятий: штамм №478 выделен в Оренбургской области, штамм №490 – в Ростовской области, штамм №512 в Алтайском крае, штамм №513 в Краснодарском крае, штамм №549 в Рязанской области, штамм №566 в республике Башкортостан, штамм №571 в республике Татарстан, штамм №602 в Курганской области. Штамм №617 выделен от

свободноживущей водоплавающей птицы, отстреленной в республике Башкортостан.

Выявленные на территории РФ изоляты *R. anatipestifer* по своим культуральным, морфологическим, тинкториальным, биохимическим, серологическим, патогенным свойствам являются типичными представителями своего вида. Штаммы изучены, паспортизированы и депонированы в Всероссийской коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов - возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Нуклеотидная последовательность участка 16S rRNA штамма *Riemerella anatipestifer* №566-ВИЭВ размещена в базе GenBank (MK965879).

Определена чувствительность изолятов *R. anatipestifer* к антибактериальным препаратам. Наибольшей эффективностью в отношении риимерелл обладают сизомицин, рифампицин, клиндамицин, амоксилав, амоксициллин, доксициклин, линкомицин, цефуроксим, хлорамфеникол, цефтриаксон.

При изучении патогенности культур риимерелл установлено, что биологической моделью для экспериментального воспроизведения риимереллёза являются птицы естественно-восприимчивых видов. Величина LD₅₀ культур риимерелл составила $2,20 \cdot 10^7 - 1,08 \cdot 10^9$ м.к. Штаммы *R. anatipestifer* №549, №566 и №490 являются наиболее вирулентными, т.к. значение LD₅₀ для них составляет $2,20 \cdot 10^7$, $5,31 \cdot 10^7$, $8,25 \cdot 10^7$ м.к., соответственно.

В результате проведенных исследований также установлено, что на территории РФ, а именно в обследованных нами птицеводческих предприятиях, циркулирует как минимум три серотипа *R. anatipestifer*, не обладающих перекрёстной антигенной активностью. Все штаммы риимерелл обладают антигенной активностью, находящейся в диапазоне значения от 1:93 - 1:173.

В ходе выполнения опыта по определению безвредности, антигенной активности и эффективности применения вакцины на птице в промышленных условиях предприятия Республики Башкортостан, установлено, что экспериментальная вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы «РеймерДак-ВИЭВ», изготовленная ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, является

безопасным, активным и высоко эффективным иммунобиологическим препаратом, обладающим необходимой протективной эффективностью при использовании в неблагополучных по риимереллёзу птицеводческих хозяйствах, и может быть рекомендована для практического использования.

Выводы

1) Впервые на территории Российской Федерации подтверждено циркулирование *Riemerella anatipestifer*, являющейся возбудителем риимереллёза водоплавающих птиц. При эпизоотологическом обследовании 12 предприятий риимереллёз установлен в 8 из них, что составляет 66,7%. Неблагополучными по риимереллёзу регионами являются Курганская, Оренбургская, Ростовская, Рязанская области, республики Татарстан и Башкортостан, Алтайский и Краснодарский края.

2) Разработанная схема лабораторной диагностики риимереллёза водоплавающих птиц, регламентирующая порядок отбора и пересылки образцов материала, последовательность бактериологического исследования и принципы постановки диагноза на риимереллёз водоплавающей птицы, позволила выделить и идентифицировать 88 изолятов *R. anatipestifer* и *R. columbina*.

3) Циркулирующие на территории Российской Федерации изоляты *Riemerella anatipestifer* представлены, как минимум, тремя различными серотипами, не обладающими перекрестной антигенной и иммуногенной активностью: изоляты из Оренбургской и Ростовской областей, Башкортостана, Алтайского края (№478, 490, 512, 566, 617) относятся к одному серотипу; Краснодарского края и Татарстана (№513, 571) ко второму; Рязанской и Курганской областей (№549, 602) к третьему серотипу.

4) Изоляты *Riemerella anatipestifer* высокочувствительны к сизомицину, рифампицину, клиндамицину, амоксиклаву, амоксициллину, доксициклину, линкомицину, цефуроксиму, хлорамфениколу, цефтриаксону; резистентны к азитромицину, азтреонаму, ломефлоксацину, пефлоксацину, спирамицину, цефтазидиму.

5) Установлено, что лабораторной моделью для экспериментального воспроизведения риимереллёза являются птицы естественно-восприимчивых видов, при этом гибель утят 10-ти дневного возраста при внутримышечном заражении наступает в течение 24-96 часов. Величина LD₅₀ культур риимерелл для утят составляет $2,20 \cdot 10^7$ - $1,08 \cdot 10^9$ м.к. Белые мыши невосприимчивы к заражению *Riemerella anatipestifer* при подкожном, внутримышечном и внутрибрюшинном введении.

6) Экспериментально обоснована возможность специфической профилактики риимереллёза водоплавающей птицы путём двукратной иммунизации инактивированными антигенами *R. anatipestifer*, обеспечивающей выживание не менее 90 % иммунизированных утят при гибели всех контрольных, после заражения вирулентными штаммами в дозе 5 LD₅₀. При этом установлено, что защитный уровень антител у вакцинированной птицы должен быть не менее чем 1:106 с оценкой на два креста и выше.

7) Вакцина против риимереллёза инактивированная экспериментальная «РеймерДак-ВИЭВ» безвредна для водоплавающих птиц всех возрастных групп, начиная с 10-дневного возраста, в рекомендованной - 1 см³ и удвоенной дозах - 2 см³ при однократном и двукратном введении.

8) Вакцина «РеймерДак-ВИЭВ» при двукратном введении индуцирует у иммунизированных птиц образование антител в титре 1:160-1:192 и обеспечивает сохранность 96,32% молодняка, полученного от вакцинированного родительского стада, при сохранности 93,76 % утят в контрольной группе, что свидетельствует о высокой иммуногенности и специфической эффективности препарата при профилактике риимереллёза в неблагополучных предприятиях.

7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты выполненной научно-исследовательской работы обобщены, систематизированы и заложены в основу разработанных методических указаний «Диагностика риимереллёза водоплавающих птиц», одобренные Ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и утвержденные Российской академией наук 20 марта 2019 года.

Полученные штаммы *R. anatipestifer* №478, 490, 512, 566, 617, 513, 571, 549, 602, изучены, паспортизированы и депонированы в Всероссийской коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, и могут быть использованы как для проведения научно-исследовательских работ, так и для изготовления средств специфической профилактики риимереллёза водоплавающей птицы.

Разработан и утверждён стандарт организации ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН СТО 00496165-0003-2018 «Производственные и контрольные штаммы *Riemerella anatipestifer* (метод изготовления и контроля посевных материалов)», регламентирующий работу со штаммами *Riemerella anatipestifer*.

Разработан стандарт ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН СТО 00496165-0004-20018 «Вакцина против риимереллёза водоплавающих птиц инаktivированная «РеймерДак-ВИЭВ», позволяющий проводить всестороннюю оценку качества выпускаемого иммунобиологического средства против риимереллёза.

Разработана инструкция по ветеринарному применению «Вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ».

8. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Ветеринарным специалистам птицеводческих предприятий и частных индивидуальных хозяйств рекомендуется проводить мониторинг риимереллёза, направляя в лаборатории материал для исследования бактериологическими, молекулярно-биологическими и масспектрометрическими методами. С целью индикации и видовой идентификации возбудителя заболевания, а также совершенствования лечебно-профилактических мероприятий, направленных против риимереллёза, использовать новые схемы и методы, предложенные в данной работе.

При проведении лабораторных диагностических исследований для индикации и идентификации *R. anatipestifer*, в том числе бактерионосительства, рекомендуется использовать разработанные и утвержденные методические указания «Диагностика риимереллёза водоплавающих птиц».

Охотоводческим предприятиям проводить плановые бактериологические исследования секционного материала, полученного от отстреленной водоплавающей птицы с целью оценки эпизоотической ситуации по распространённости риимереллёза в стране.

Штамм *R. anatipestifer* №566 рекомендуется использовать в качестве контрольно-производственного при разработке средств специфической профилактики риимереллёза водоплавающих птиц и контроле иммуногенной активности препаратов.

Результаты научной работы могут быть использованы при разработке технологии изготовления иммунобиологических лекарственных средств против риимереллёза водоплавающей птицы.

9. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП – антибактериальные препараты;

ВНИИЗЖ – Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных;

ГОА – гидроокись алюминия;

гг. – года;

гр – грамм;

гол. – голов;

др. – другие;

ИФА – иммуноферментный анализ;

КОЕ – колониеобразующая единица;

м. к. – микробные клетки;

млрд. м. к. – миллиардов микробных клеток;

м. к. /см³ – микробных клеток в сантиметре кубическом;

МПА – мясо-пептонный агар;

МПБ – мясо-пептонный бульон;

МУК – методические указания;

нм – нанометр;

об/мин – оборотов в минуту;

ООО – общество с ограниченной ответственностью;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

РА – реакция агглютинации;

РАН – Российская Академия Наук;

РН – реакция нейтрализации;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

соавт. – соавторы;

СТО – стандарт организации;

ч – часов;

CLSI - Институт клинических и лабораторных стандартов;

EUCAST – Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности;

GenBank - база данных, находящаяся в открытом доступе, содержащая все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков;

LPS – липополисахариды;

LD₅₀ – летальная доза;

MALDI ToF – времяпролетная спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией;

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США;

R. anatipestifer – *Riemerella anatipestifer*.

10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейант, Р. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных) / Р. Вейант, У. Мосс, Р. Уивер // Справочник. – М.: Мир. – 1999. – 790 с.
2. Лизун, Р. Риемереллез уток. Инфекцию можно остановить. / Р. Лизун // Белорусское сельское хозяйство. – 2015. – № 5. – С. 72-76.
3. Лысак, В.В. Микробиология практикум. / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова, О.В. Фомина // Минск. – 2015. – 116 с.
4. Потехин, А.В. Новые угрозы в птицеводстве требуют новых стратегий / А.В.Потехин // Ветеринария и Жизнь. – 2018. - № 3. – С. 10.
5. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Д.Ж. Стейли, С. Уильямс // Под ред.; в 2-х т. – М.: Мир. – 1997. – Т.1. – 432 с.
6. Afrin, F. Downregulation of common cytokine receptor γ chain inhibits inflammatory responses in macrophages stimulated with *Riemerella anatipestifer*. / F. Afrin, C.P. Fernandez, R.A. Flores, W.H. Kim, J. Jeong, H.H. Chang, S. Kim, H.S. Lillehoj, W. Min // Developmental & Comparative Immunology. – 2018. – 81. – P. 225-234.
7. Armand, C. Etude du portage d'agents pathogènes respiratoires chez le canard mulard et conséquences cliniques / C. Armand // Th: Med.vet: Toulouse. – 2005. – 3. – P. 89.
8. Asplin, F.D. Experiments on the transmission of septicaemic disease of ducklings. / F.D. Asplin // Veterinary Record –1956. – 68. – P. 588 – 590.
9. Backert, S. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. / S. Backert, T.F. Meyer // Current Opinion in Microbiology. – 2006. – 9. – P. 207–217.
10. Barre, B. Contribution à l'étude des genres *Riemerella* et *Coenonia*: importance en médecine Vétérinaire Th. / B. Barre // Med.vet: Toulouse – 2003. – 3. – P. 137.

11. Bisgaard, M. Antigenic studies on *Pasteurella anatis*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination. / M. Bisgaard // *Avian Pathology*. – 1982. – 11. – P. 341–350.
12. Bisgaard, M. Salpingitis in web-footed birds: prevalence, aetiology and significance. / M. Bisgaard // *Avian Pathology*. – 1995. – 24. – P. 443.
13. Boissieu, C. Herpès-virose du canard: un point d'actualité / C. Boissieu, T.G. Bich, J.L. Guerin // 11ème journée technique de la SEPALM Bazas (France) – 2006. – 6.
14. Boissieu, C. L'herpès-virose ou peste du canard, une maladie mésestimée? / C. Boissieu, A. Mercier, T. Gavaret, J.L. Guerin // *Le Nouveau Praticien Vétérinaire élevage ET santé*. – 2006. – 1. – P. 67-70.
15. Bruner, DW. A strain of *Moraxella anatis* (*Pfeifferella anatis*) isolated from ducks. / DW. Bruner, J. Fabricant // *The Cornell Veterinarian*. – 1954. – 44. – P. 461-464.
16. Cha, S.Y. Surveillance and characterization of *Riemerella anatis* from wild birds in South Korea. / S.Y. Cha, H.S. Seo, B. Wei, M. Kang, J.H. Roh, R.H. Yoon, J.H. Kim, H.K. Jang // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2015. – 2. – P. 341-347.
17. Chen, Y.P. Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatis* isolated from ducks and geese. / Y.P. Chen, S.H. Lee, C.H. Chou, H.J. Tsai // *Veterinary Microbiology*. – 2012. – 154. – P. 325–331.
18. Chen, Y.P. Prevalence and molecular characterization of chloramphenicol resistance in *Riemerella anatis* isolated from ducks and geese in Taiwan. / Y.P. Chen, M.Y. Tsao, S.H. Lee, C.H. Chou, H.J. Tsai // *Avian Pathology*. – 2010. – 39(5). – P. 333.
19. Chikuba, T. *Riemerella anatis* infection in domestic ducks in Japan, 2014. / T. Chikuba, H. Uehara, S. Fumikura, K. Takahashi, Y. Suzuki, K. Hoshino, Y. Yamamoto // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2016. – 78(10). – P.1635-1638.
20. Chu, C.Y. Development of a subunit vaccine containing recombinant *Riemerella anatis* outer membrane protein A and CpG ODN adjuvant. / CY. Chu, CH. Liu, JJ. Liou, JW. Lee, LT. Cheng // *Vaccine*. – 2015. – 33(1). – P.92-99.

21. Corbel, M. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. / M. Corbel, C. Belleguic, E. Boichot, V. Lagente // Cell Biology and Toxicology. – 2002. – 18. – P. 51–61.
22. Cortez, de J.S. *Riemerella anatipestifer* in turkeys case report. / de J.S. Cortez, D. Fulhorst, D. Aldehoff // 2004. – Proceedings of the 5th International Symposium on Turkey Diseases. Berlin, Germany.
23. Crasta, K.C. Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. / K.C. Crasta, K.L. Chua, S. Subramaniam, J. Frey, H. Loh, H.M. Tan // Journal of Bacteriology. – 2002. – 184. – P. 1932–1939.
24. Diaz, J.A. Identification and expression analysis of duck interleukin-17D in *Riemerella anatipestifer* infection. / J.A. Diaz, W.H. Kim, C.P. Fernandez, J. Jeong, F. Afrin, H.S. Lillehoj, S. Kim, S. Kim, R.A. Dalloul, W. Min // Developmental & Comparative Immunology. – 2016. – 61. – P. 190-197.
25. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – 15. – P. 167-193.
26. Dou, Y. Disruption of the M949_RS01915 gene changed the bacterial lipopolysaccharide pattern, pathogenicity and gene expression of *Riemerella anatipestifer*. / Y. Dou, X. Wang, G. Yu, S. Wang, M. Tian, J. Qi, T. Li, C. Ding, S. Yu // Veterinary Research. – 2017. – 6. – 48(1) – P. 1-11.
27. Dou, Y. The *Riemerella anatipestifer* M949_RS01035 gene is involved in bacterial lipopolysaccharide biosynthesis. / Y. Dou, G. Yu, X. Wang, S. Wang, T. Li, M. Tian, J. Qi, C. Ding, S. Yu // Veterinary Research. – 2018. – 17. – 49(1) – P. 1-13.
28. Fernandez, C.P. Downregulation of inflammatory cytokines by berberine attenuates *Riemerella anatipestifer* infection in ducks. / C.P. Fernandez, F. Afrin, R.A. Flores, W.H. Kim, J. Jeong, S. Kim, H.H. Chang, H.S. Lillehoj, W. Min // Developmental & Comparative Immunology. – 2017. – 77. – P. 121-127.
29. Fernandez, CP. Upregulation of duck interleukin-17A during *Riemerella anatipestifer* infection. / CP. Fernandez, WH. Kim, JA. Diaz, J. Jeong, F. Afrin, S. Kim,

HK. Jang, BH. Lee, D. Yim, HS. Lillehoj, W. Min // Developmental & Comparative Immunology. – 2016. – 63(36) – P. 31-46.

30. Floren, U. Pasteurella anatipestifer sp.i.c. Bei Pekingenten Pathogenitätsprüfungen und Immunisierung mit einer inaktivierten, homologen, monovalenten (serotyp 6/B) Lemulsionsvakzine. / U. Floren, PK. Storm, EF. Kaleta // Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. – 1988. – 95. – P. 210.

31. Floren, U. Pasteurella anatipestifer-infektion des Wasser u. gels. / U. Floren, B. Wiedeking, B. Kissel, E.F. Kaleta // Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. – 1987. – 94. – P. 525-534.

32. Glünder, G. Isolation of Moraxella anatipestifer from embryonated goose eggs. / G. Glünder, K.H. Hinz // Avian Pathology. – 1989. – 18. – P. 351-355.

33. Gough, R.E. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks. / R.E. Gough, D. Spackman // Avian Pathology. – 1981. – 10(4). – P. 471-479.

34. Graham, R. Studies on duck septicaemia. / R. Graham, CA. Brandly, GL. Dunlop // The Cornell Veterinarian. – 1938. – 28. – P. 1-8.

35. Guo, S. Effects of Anti-bursin monoclonal antibody on immunosuppression in the duck (cherry valley duck). / S. Guo, N.-H. Chen, R. Guan, J. Feng, W. Huang // Poultry science. – 2006. – 85(2). – P. 258-265.

36. Guo, Y. Riemerella anatipestifer Type IX Secretion System Is Required for Virulence and Gelatinase Secretion. Y. Guo, D. Hu, J. Guo, T. Wang, Y. Xiao, X. Wang, S. Li, M. Liu, Z. Li, D. Bi, Z. Zhou // Frontiers in Microbiology. – 2017. – 8. – P. 25-53.

37. Han, X. Identification and immunological characteristics of chaperonin GroEL in Riemerella anatipestifer. / X. Han, Q. Hu, S. Ding, W. Chen, C. Ding, L. He, X. Wang, J. Ding, S. Yu // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2012. – 93. – P. 1197-1205.

38. Harry, E.G. Laboratory and field trials on a formalin inactivated vaccine for the control of Pasteurella anatipestifer in ducks. / E.G. Harry, J.R. Deb // Research in Veterinary Science. – 1979. – 27. – P. 329-333.

39. Helfer, D.H. Case report *Pasteurella anatipestifer* infection in turkeys. / D.H. Helfer, F. Hemboldt // *Avian Diseases*. – 1977. – 21. – P. 712-715.
40. Hendrickson, J.M. A new and serious septicaemic disease of young ducks with a description of the causative organism, *Pfeifferella anatipestifer*. / J.M. Hendrickson, K.F. Hilbert. // *NS Cornell Veterinarian*. – 1932. – 22. – P. 239-252.
41. Higginsa, D.A. Duck immune responses to *Riemerella anatipestifer* vaccines / D.A. Higginsa, R.R. Henry, Z.V. Kounev // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2000. – 24. – P. 153-167.
42. Hinz, K.H. Detection of acid production from carbohydrates by *Riemerella anatipestifer* and related organisms using the buffered single substrate test. / K.H. Hinz, M. Ryll, B. Kohler. // *Veterinary Microbiology*. – 1998. – 60. – P. 277–284.
43. Hu, Q. Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer*. / Q. Hu, X. Han, X. Zhou, S. Ding, C. Ding, S. Yu. // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – 144. – P. 429-436.
44. Hu, Q. OmpA is a virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. / Q. Hu, X. Han, X. Zhou, C. Ding, Y. Zhu, S. Yu // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – 150(3-4). – P. 278-283.
45. Hu, Q. The epidemiology study of *Riemerella anatipestifer* infection in Jiangsu and Anhui provinces. / Q. Hu, X. Liu, J. Miao, D. Zhao, L. Zhang, C. Ding. // *Guide Chin. Poult*. – 2001. – 18. – P. 18-19.
46. Huang, B. Development of an ELISA using a recombinant 41 kda partial protein (p45n') for the detection of *Riemerella anatipestifer* infections in ducks. / B. Huang, J. Kwang, H. Loh, J. Frey, H.M. Tan, K.L. Chua // *Veterinary Microbiology*. – 2002. – 88(4) – P. 339-349.
47. Huang, B. Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (OmpA) and a 41 kDa partial protein (P45N') of *Riemerella anatipestifer*. / B. Huang, S. Subramaniam, J. Frey, H. Loh, H.-M. Tan, C.J. Fernandez, J. Kwang, K.-L. Chua // *Veterinary Microbiology*. – 2002. – 84(3) – P. 219-230.

48. Kalynych, S. Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. / S. Kalynych, R. Morona, M. Cygler // FEMS Microbiology. – 2014. – 38 – P. 1048-1065.
49. Kang, M. Immunogenicity and safety of a live *Riemerella anatipestifer* vaccine and the contribution of IgA to protective efficacy in Pekin ducks. / M. Kang, HS. Seo, SH. Soh, HK. Jang // Veterinary Microbiology. – 2018. – 222. – P. 132-138.
50. Kardos, G. Development of a novel PCR assay specific for *Riemerella anatipestifer*. / G. Kardos, J. Nagy, M. Antal, A. Bistyak, M. Tenk, I. Kiss. // Letters in Applied Microbiology. – 2007. – 44(2). – P. 145–148.
51. Karstard, L. *Pasteurella anatipestifer* as a cause of mortality in captive wild waterfowl. / L. Karstard, P. Lusi, JR J. Long. // Journal of Wildlife Diseases. – 1970. – 6. – P. 408-413.
52. Köhler, B. *Riemerella anatipestifer* as pathogen for geese in the northern and central parts of Germany. / B. Köhler, R. Heiss, K. Albrecht. // In Proceeding of the 49th Symposium on Poultry Diseases of the German Veterinary Medicine Society, Giessen, Germany. – 1995. – P.50-71.
53. Laishevtcev, A.I. Clinico-morphological manifestation of waterfowls' *riemerellosis* and biological features of disease causative agent / A.I. Laishevtcev, A.V. Kapustin, N.V. Pimenov, V.D. Iliesh // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – 11(71). – P. 538-545.
54. Laishevtcev, A.I. Experience in creating the first native vaccine against *riemerellosis* / A.I. Laishevtcev, E.A. Yakimova, A.V. Kapustin // Veterinary science. – 2018. – № 8. – P. 24-29.
55. Leibovitz, L. A survey of the so-called “*anatipestifer syndrome*”. / L. Leibovitz. // Avian Diseases. – 1972. – 16. – P. 836-851.
56. Liu, H. Development and evaluation of a trivalent *Riemerella anatipestifer*-inactivated vaccine. / H. Liu, X. Wang, C. Ding, X. Han, A. Cheng, S. Wang. // Clinical and Vaccine Immunology. – 2013. – 20(5). – P. 691–7.

57. Liu, Y. Analysis of outer membrane proteins of *Riemerella anatipestifer*. / Y. Liu, Q. Wei, G. Bao, Q. Ji // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. – 2008. – 24(4). – P. 586-591.
58. Lobbedey, L. Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and in serum of their offspring. / L. Lobbedey, B. Schlatterer. // *Journal of Veterinary Medicine*. – 2003. – 50. – P. 81–85.
59. Loh, H. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from ducks in Singapore. / H. Loh, TP. Teo, HC. Tan. // *Avian Pathology*. – 1992. – 21. – P. 453-459.
60. Lu, F. The role of TonB-dependent receptor TbdR1 in *Riemerella anatipestifer* in iron acquisition and virulence. / F. Lu, S. Miao, J. Tu, X. Ni, L. Xing, H. Yu, L. Pan, Q. Hu // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – 167(3-4). – P. 713-718.
61. Magyar, T. Genotyping of *Riemerella anatipestifer* by ERIC-PCR and correlation with serotypes. / T. Magyar, É. Gyuris, B. Ujvári, M. Metzner, E. Wehmann // *Avian Pathology*. – 2019. – 48(1). – P. 12-16.
62. Mahitanan, W. Infectious serositis in ducklings. / W. Mahitanan, W. Bunyanurak, P. Suksattaichana, O. Arunsakul. // *Kasetsart Veterinarians*. – 1982. – 3. – P. 124-130.
63. Moxon, E. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors, in: *Bacterial Capsules*. / E. Moxon, J. Kroll // Springer. – 1990. – P. 65-85.
64. Munday, BL. Isolation of *Pasteurella anatipestifer* from black swan (*Cygnus artratus*). / BL. Munday, A. Corbould, KL. Heddlestone, EG. Harry. // *Australian Veterinary Journal*. – 1970. – 46. – P. 322-325.
65. Pathanasophon, P. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. / P. Pathanasophon, P. Phuektes, T. Tanticharoenyos. // *Avian Pathology*. – 2002. – 31. – P. 267-270.
66. Pathanasophon, P. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrate in ducks. / P. Pathanasophon, T. Sawada, T. Pramoolsinsap, T. Tanticharoenyos // *Avian Pathology*. – 1996. – 25(4). – P. 705-719.

67. Pathanasophon, P. Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. / P. Pathanasophon, T. Tanticharoenyos, T. Sawada. // *Veterinary Microbiology*. – 1994. – 39. – P. 179–185.
68. Phonvisay, M Evaluation of Long-term Antibody Response and Cross-serotype Reaction in Ducks Immunised with Recombinant *Riemerella Anatipestifer* Outer Membrane Protein A and CpG ODN. / M. Phonvisay, JW. Lee, JJ. Liou, HY. Wang, CY. Chu // *Journal of Veterinary Research*. – 2019. – 63(4). – P. 543-548.
69. Piechulla, K. Phenotypic and genetic relationships of so-called *Moraxella* (*Pasteurella*) *anatipestifer* to the *Flavobacterium/Cytophaga* group. / K. Piechulla, S. Pohl, W. Mannheim. // *Veterinary Microbiology*. – 1986. – 11. – P. 261–270.
70. Pierce, RL. *Pasteurella anatipestifer* infection in geese. / RL. Pierce, MW. Vorhies. // *Avian Diseases*. – 1973. – 17. – P. 868-870.
71. Priya, PM. Studies on outbreak of New Duck disease in Kerala, India. / PM. Priya, DS. Pillai, C. Balusamy, P. Rameshkumar, P. Senthamilselvan. // *International Journal of Poultry Science*. – 2008. – 7. – P. 189-190.
72. Reeves, PP. Genomic Organization of LPS-Specific Loci. / PP. Reeves, L. Wang. // *Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes*. Springer, Berlin Heidelberg. – 2002. – Vol I. – P. 444.
73. Riemer, O. Kurze Mitteilung über eine bei Gänsen beobachtete exsudative Septikämie und deren Erreger. / O. Riemer // *Zentbl Bakteriol I Abt Orig*. – 1904. –37. – P. 641-648.
74. Rojas-Macias, MA. Development of the ECODAB into a relational database for *Escherichia coli* O-antigens and other bacterial polysaccharides. / MA. Rojas-Macias, J. Stähle, T. Lütteke, G. Widmalm // *Glycobiology*. – 2014. –3. – P. 341-347.
75. Rosenfeld, LE. *Pasteurella anatipestifer* infection in fowls in Australia. / LE. Rosenfeld. // *Australian Veterinary Journal*. – 1973. – 49. – P. 55-56.

76. Rubbenstroth, D. Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica), and emended description of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina*. / D. Rubbenstroth, M. Ryll, H. Hotzel, H. Christensen, J.K.M. Knobloch, S. Rautenschlein, M. Bisgaard. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – 63. – P. 280-287.
77. Rubbenstroth, D. Evaluation of different diagnostic tools for the detection and identification of *Riemerella anatipestifer*. / D. Rubbenstroth, M. Ryll, JK. Knobloch, B. Kohler, S. Rautenschlein. // Avian Pathology. – 2013. – 42(1). – P. 17–26.
78. Rubbenstroth, D. Isolation and characterization of atypical *Riemerella columbina* strains from pigeons and their differentiation from *Riemerella anatipestifer*. / D. Rubbenstroth, H. Hotzel, J. Knobloch, L. Teske, S. Rautenschlein, M. Ryll. // Veterinary Microbiology. – 2011. –147. – P. 103-112.
79. Rubbenstroth, D. Pathogenesis of *Riemerella anatipestifer* in turkeys after experimental mono-infection via respiratory routes or dual infection together with the avian metapneumovirus. / D. Rubbenstroth, M. Ryll, KP. Behr, S. Rautenschlein // Avian Pathology. – 2009. –38. – P. 497-507.
80. Ryll, M. Studies on the prevalence of *Riemerella anatipestifer* in the upper respiratory tract of clinically healthy ducklings and characterization of untypable strains. / M. Ryll, H. Christensen, M. Bisgaard, JP. Christensen, K.H. Hinz, B. Köler. // Journal of Veterinary Medicine. – 2001. – 48(7). – P. 537-546.
81. Sandhu, T. Immunization of White Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection. / T. Sandhu. // Avian Diseases. – 1979. – 23. – P. 662-669.
82. Sandhu, T. *Riemerella anatipestifer* infection. / T. Sandhu, R. Rimler. // Diseases of poultry. – 10th Ed London: Iowa State University Press, Ames Mosby-Wolfe. – 1997.
83. Sandhu, T. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* Isolated from Commercial White Pekin Ducks in the United States / T. Sandhu, E.G. Harry // Avian Diseases. – 1981. – 25(2). – P. 497-502.

84. Sandhu, TS. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella anatis* vaccine in White Pekin ducklings: laboratory and field trials. / TS. Sandhu. // Avian Pathology. – 1991. – 20(3). – P. 423-432.
85. Sandhu, TS. Important diseases of ducks. / TS. Sandhu, DJ. Farrell, P. Stapleton P. // Duck production science and world practice. Australia: University of New England. – 1986. – P. 111-134.
86. Sandhu, TS. Laboratory and field trials with formalin-inactivated *Escherichia coli* (O78)-*Pasteurella anatis* bacterin in white pekkin ducks. // TS. Sandhu, HW. Layton // Avian Diseases. – 1985. – 29(1). – P. 128-135.
87. Sarver, CF. The effect of route of inoculation and challenge dosage on *Riemerella anatis* infection in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). / CF. Sarver, TY. Morshita, B. Nergessaian. // Avian Diseases. – 2005. – 49 (1). – P. 104-107.
88. Shome, R. An outbreak of *Riemerella anatis* infection in ducks in Meghalaya. / R. Shome, BR. Shome, H. Rahman, HV. Murugkar, A. Kumar, BP. Bhatt, KM. Bujarbaruah. // Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis. – 2004. – 25. – P. 126-127.
89. Smith, J.M. *Pasteurella anatis* infection in commercial meat-type turkeys in California. / J.M. Smith, D.D. Frame, G. Cooper, A.A. Bickford, G.Y. Ghazikhanian, B.J. Kelly. // Avian Diseases. – 1987. – 31. – P. 910-917.
90. Soike, D. A circovirus-like infection in geese related to a runtting syndrome. / D. Soike, B. Kohler, K. Albrecht. // Avian Pathology. – 1999. – 28(2). – P. 199-202.
91. Sun, N. Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatis* isolated from ducks. / N. Sun, JH. Liu, F. Yang, DC. Lin, GH. Li, ZL. Chen. // Veterinary Microbiology. – 2012. – 158(3–4). – P. 376-383.
92. Talebi, A. Efficacy of CpG-ODN Administration Routes on Humoral Responses against Newcastle disease in Broilers. / A. Talebi, S. Arky-Rezai // Archives of Razi Institute. – 2019. – 74(4). – P. 357-364.

93. Timms, LM. Laboratory assessment of protection given by experimental *Pasteurella anatipestifer* vaccine. / LM. Timms, RN. Marshall. // *British Veterinary Journal*. – 1989. – 145. – P. 483-493.
94. Todd, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. / D. Todd. // *Avian Pathology*. – 2000. – 29(5). – P. 373-394.
95. Tsai, HJ. Genetic variation of the ompA and 16S rRNA genes of *Riemerella anatipestifer*. / HJ. Tsai, YT. Liu, CS. Tseng, MJ. Pan. // *Avian Pathology*. – 2005. – 34. – P. 55-64.
96. [Электронный ресурс]: Открытый доступ, URL: <http://www.bacterio.net>
97. Vancanneyt, M. *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons. / M. Vancanneyt, P. Vandamme, P. Segers, U. Torck, R. Coopman, K. Kersters, K.H. Hinz. // *international Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1999. – 49. – P. 289-295.
98. Vandamme, P. Capnophilic bird pathogens in the family Flavobacteriaceae: *Riemerella*, *Ornithobacterium* and *Coenonia*. / P. Vandamme, HM. Hafez, KH. Hinz, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt // *The Prokaryotes*, 3rd Ed, vol 7. Springer, Singapore. – 2006. – P. 695-708.
99. Wang, M. Identification of the ferric iron utilization gene B739_1208 and its role in the virulence of *R. anatipestifer* CH-1. / M. Wang, P. Zhang, D. Zhu, M. Wang, R. Jia, S. Chen, K. Sun, Q. Yang, Y. Wu, X. Chen, F. Biville, A. Cheng, M. Liu // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – 201. – P. 162-169.
100. Wang, X. The *Riemerella anatipestifer* AS87_01735 Gene Encodes Nicotinamidase PncA, an Important Virulence Factor. / X. Wang, B. Liu, Y. Dou, H. Fan, S. Wang, T. Li, C. Ding, S. Yu // *Applied and Environmental Microbiology*. 2016. – 82(19). – P. 15-23.
101. Xu, X. Evaluation of the protective immunity of *Riemerella anatipestifer* OmpA. / X. Xu, Y. Xu, S. Miao, P. Jiang, J. Cui, Y. Gong, P. Tan, X. Du, N. Islam, Q. Hu // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – 104(3). – P. 1273-1281.
102. Yakimova, E.A. Antibiotic resistance of pathogen of rimerelelles of waterfowl / E.A. Yakimova // *Veterinaria I kormlenie*. – 2018. – № 7. – P. 25-28.

103. Zhai, Z Immunoproteomics selection of cross-protective vaccine candidates from *Riemerella anatipestifer* serotypes 1 and 2. / Z. Zhai, X. Li, X. Xiao, J. Yu, M. Chen, Y. Yu, G. Wu, Y. Li, L. Ye, H. Yao, C. Lu, W. Zhang // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – 162(2-4). – P. 850-857.
104. Zhao, X. Identification of a gene in *Riemerella anatipestifer* CH-1 (B739-2187) that contributes to resistance to polymyxin B and evaluation of its mutant as a live attenuated vaccine. / X. Zhao, Q. Liu, J. Zhang, Y. Luo, Y. Luo, Q. Liu, P. Li, Q. Kong // *Microbial Pathogenesis*. – 2016. – 91. – P. 99-106.
105. Zhong, C.Y. Antibiotic susceptibility of *Riemerella anatipestifer* field isolates. / C.Y. Zhong, A.C. Cheng, M.S. Wang, D.K. Zhu, Q.H. Luo, C.D. Zhong, L. Li, Z. Duan // *Avian Diseases*. – 2009. – 53(4). – P. 601-607.
106. Zhou, Z. Identification of *Riemerella anatipestifer* genes differentially expressed in infected duck livers by the selective capture of transcribed sequences technique. / Z. Zhou, J. Zheng, W. Tian, J. Li, W. Zhang, J. Zhang, X. Meng, S. Hu, D. Bi, Z. Li. // *Avian Pathology*. – 2009. – 38(4). – P. 321-329.
107. Zou, J. The M949_1556 gene plays a role on the bacterial antigenicity and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer*. / J. Zou, X. Wang, M. Tian, S. Cao, W. Hou, S. Wang, X. Han, C. Ding, S. Yu // *Veterinary Microbiology*. – 2015. – 15(5). – P. 193-200.
108. Zou, J Characterization and cross-protection evaluation of M949_1603 gene deletion *Riemerella anatipestifer* mutant RA-M1. / J. Zou, X. Wang, C. Ding, M. Tian, X. Han, S. Wang, S. Yu // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – 99(23). – P.107-116.

11. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Документ	Стр.
1.	Методические указания «Диагностика риимереллёза водоплавающих птиц»	108
2.	Паспорт штамма микроорганизмов <i>Riemerella anatipestifer</i> «566-ВИЭВ»	109
3.	Свидетельство о депонировании штамма <i>Riemerella anatipestifer</i> «566-ВИЭВ»	111
4.	Стандарт организации «Производственные и контрольные штаммы <i>Riemerella anatipestifer</i> (метод изготовления и контроля посевных материалов)»	112
5.	Стандарт организации «Вакцина против риимереллеза водоплавающих птиц инаktivированная «РеймерДак-ВИЭВ» (технические условия)»	113
6.	Временная инструкция по применению вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной – «РеймерДак-ВИЭВ»	114
7.	Этикетка для вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной – «РеймерДак-ВИЭВ»	116
8.	Акт клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ»	117
9.	Диплом о награждении серебряной медалью коллектива ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН за разработку вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ» на выставке «Золотая осень- 2018»	118

Приложение 1.

Методические указания «Диагностика риимереллёза водоплавающей птицы»

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
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)

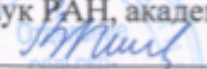
УТВЕРЖДАЮ

Руководитель секции

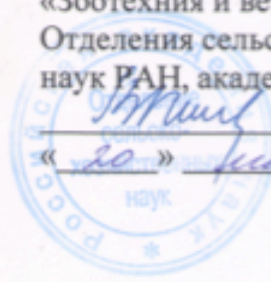
«Зоотехния и ветеринария»

Отделения сельскохозяйственных

наук РАН, академик РАН

 В. В. Калашников

« 20 » марта 2019 г.



Диагностика риимереллёза водоплавающих птиц

Методические указания

Москва, 2019

Приложение 2.

Паспорт штамма микроорганизмов *Riemerella anatipestifer* «566-ВИЭВ»

ФАНО РОССИИ

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)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428

Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ОКПО 00496165, ОГРН 1037700258870, ИНН/КПП 7721017821/772101001

ПАСПОРТ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

1. Вид микроорганизма: *Riemerella anatipestifer* «566-ВИЭВ».
2. Номер в других коллекциях: *нет*
3. Основание для депонирования: *Эпизоотический изолят*
4. Родословная: *нет*
5. Патогенность: *в соответствии с классификацией микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности санитарных правил 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» бактериальные агенты вида Riemerella anatipestifer не относятся ни одной из четырёх групп патогенности.*
6. Заключение о группе патогенности: *не определялось*
7. Дата, источник и место выделения: *ООО «Племптицезавод Благоварский», Республика Башкортостан, Благоварский район, село Языково. В 2017 году от утёнка.*
8. Где идентифицирована культура: *лаборатория микробиологии и музей типовых культур ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского*
9. Методы идентификации: *посредством изучения ферментативных свойств и определением нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA*
10. Морфологические признаки: *Riemerella anatipestifer является неподвижной и не спорообразующей грамотрицательной палочкой средними размерами 0,3-0,5*1-2,5 мкм. В мазках клетки располагаются одиночно, парно или в виде небольших цепочек.*
11. Культуральные особенности: *На плотных питательных средах при культивировании в 5%-ной CO₂ атмосфере в течение 48 и более часов и температуре 37 °С, наблюдается рост гладких, непигментированных колоний, мукоидной консистенции. При культивировании на средах, содержащих дефибринированную кровь барана, гемолиз отсутствует. При этом в ходе выполнения работы было установлено, что рост Riemerella anatipestifer на агаризованных средах может проявляться в виде крупных отдельных колоний средним размером 2-5 мм на 2-ой день культивирования или в виде сплошного роста.*
12. Биохимические свойства: *Культура оксидазо-, каталазо-, альфа-глюкоронидазо- и аргининдекарбоксилазо- положительная, бета-галактозидазо-, орнитин- и лизиндекарбоксилазо- отрицательная, образовывала индол и сероводород, разжижала желатин, не ферментировала арабинозу, глюкозу, маннозу, маннитол, мальтозу, сорбитол, сахарозу, трегалозу и ксилозу.*
13. Серологические свойства: *не определялось*
14. Продукция антигенов, ферментов, токсинов: *не определялось*

15. Вирулентность для лабораторных животных: результаты биопробы, LD₅₀: 5,31*10⁷ мкр. кл.
16. Устойчивость к антибактериальным препаратам: не определялась
17. Отношение к гомо- и гетерологичным фагам (профаги): не определялось
18. Генетические характеристики: Фрагмент анализируемой нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA:

CAGCCGAGCGGTAGAGTGTCTTCGGATACTTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTG
 CAACCTGCSTTTATCTGAGGGATAGCCTTTTCGAAAGGAAGATTAATACCTCATAATATACTG
 ATTGGCATCAATTAGTATTGAAAGCTCCGGCGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATA
 GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATGATCTTTAGGGGCGCTGAGAGGGTGATCCCCC
 ACASTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAA
 TGGGTGCAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTGTAACTT
 CTTTGTACAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGGGTAGCTGAAGGTACTGTACGAATAAGCAC
 CGGTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATT
 GGGTTAAAGGGTCCGAGGCGGGCTAGTAAGTCAGTGGTGAAGCCTACAGCTTAACGTGA
 GAACTGCCGTTGATATGCTAGTCTTGAGTATAGTTGAGGTAGCTGGAATGAGTAGTGTAGC
 GGTGAAATGCATAGATATTAATCAGAACACCGATTGCGAAGGCAGGTTACCAAGTTATACT
 GACGCTGAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGT
 AAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGCTATATGGTTTCAGAGACTAAGCGAAAGTGATAAGTTAG
 CCACCTGGGGGAGTACGACCGCAAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
 CGGGTGGATCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGG

19. Дополнительные сведения:

- *Описание рекомбинантной плазмиды: не определялось
- *Сведения о клонированной ДНК: не определялось
- **Производственные показатели: не определялось
- ***Протективная активность: не определялось

Прочие:

20. Условия культивирования: микроорганизм растёт на триптиказо-соевом бульоне и на агаризированных средах, содержащих дефибринированную кровь.
21. Условия хранения: в лиофилизированном виде в ампулах. Объём лиофилизата составляет 1 см³.
22. Литературные ссылки: Laishevtcev A.I., Kapustin A.V., Pimenov N.V., Plish V.D. Clinico-morphological manifestation of waterfowls' riemerellosis and biological features of disease causative agent// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. T. 71. № 11. С. 538-545. Crossref DOI: 10.18551/rjoas.2017-11.71
23. Организация-депозитор: 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). Адрес: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корпус 1. Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru.
24. Авторы: Лаишевцев Алексей Иванович; Капустин Андрей Владимирович, к.в.н.; Якимова Эльвира Алексеевна
25. Форма депонирования: Гарантийное хранение

«11» июня 2018 г.

ВРИО директора ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

  Гулокин А.М.

Свидетельство о депонировании штамма *Riemerella anatipestifer* «566-ВИЭВ»

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

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)

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428

Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ

№ 87

«11» июня 2018 года

Всероссийская государственная коллекция патогенных и вакцинных штаммов
микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных
депонировала для целей национальной патентной процедуры

11 июня 2018 года

авторский штамм микроорганизма *Riemerella anatipestifer* «566-ВИЭВ»

Область применения штамма: штамм бактерий для производства средств
специфической профилактики риереллеза водоплавающих птиц.

Депозитор: 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). Адрес: 109428, г. Москва, Рязанский
проспект, д. 24, корпус 1. Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru.

Автор (ы): Якимова Эльвира Алексеевна; Лаишевцев Алексей Иванович; Капустин
Андрей Владимирович, к.в.н.

Штамму присвоен регистрационный номер: В-1251

Свидетельство выдано для подачи заявки на изобретение.

Заместитель директора ФГБНУ ФНЦ
ВИЭВ РАН по научной работе, д.б.н.

Заведующий лабораторией микологии и
антибиотиков имени А.Х. Саркисова,
к.в.н.



А.Д. Забережный

/ А.В. Капустин

Приложение 4.

Стандарт организации «Производственные и контрольные штаммы *Riemerella anatipestifer* (метод изготовления и контроля посевных материалов)»

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)



УТВЕРЖДАЮ

Врио директора

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

М. Гулюкин

2018 г.

**СТАНДАРТ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
СТО-00496165-0003-2018**

**ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ
RIEMERELLA ANATIPISTIFER (МЕТОД ИЗГОТОВЛЕНИЯ И
КОНТРОЛЯ ПОСЕВНЫХ МАТЕРИАЛОВ)**

Технические условия

2018 г.

Приложение 5.

Стандарт организации «Вакцина против риемереллеза водоплавающих птиц инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ» (технические условия)»

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)



**СТАНДАРТ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
СТО-00496165-0004-2018**

**ВАКЦИНА ПРОТИВ РИЕМЕРЕЛЛЕЗА ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ
ИНАКТИВИРОВАННАЯ
«РеймерДак-ВИЭВ»**

Технические условия

2018 г.

**Временная инструкция по применению вакцины против риимереллёза
водоплавающей птицы инаktivированной – «РеймерДак-ВИЭВ»**



ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной
«РеймерДак-ВИЭВ»

(организация-разработчик - ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» РАН, 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование - «РеймерДак».
- Международное непатентованное наименование – Вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированная.
2. Лекарственная форма – суспензия для инъекций. Вакцина изготовлена из инаktivированных формалином протективных антигенов *Riemerella anatipestifer* штамма №566-ВИЭВ, и полиэтиленгликоля в качестве адьюванта.
3. По внешнему виду вакцина представляет собой суспензию светло-серого цвета с серо-белым осадком, легко разбивающимся при взбалтывании в гомогенную взвесь. Срок годности вакцины – 18 месяцев с даты выпуска. По истечении срока годности вакцина к применению не пригодна. Вакцину необходимо использовать в день вскрытия флакона.
4. Вакцина расфасована по 100 мл (100 доз) в полимерные флаконы соответствующей вместимости, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками. Флаконы упакованы в картонные или пенопластовые коробки (ящики) с разделительными перегородками, обеспечивающими сохранность вакцины. В каждую коробку с вакциной вложена инструкция по ее применению.
5. Вакцину хранят и транспортируют в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8° С.
6. Вакцину следует хранить в местах, недоступных для детей.
7. Флаконы с вакциной, подвергшиеся замораживанию, без этикеток, с нарушенной укупоркой и целостностью, измененным цветом, содержащие посторонние примеси, а также вакцину, не использованную в день вскрытия флакона, выбраковывают и обезвреживают путем кипячения в течение 15 мин с последующей утилизацией. Утилизация обезвреженного препарата не требует соблюдения специальных мер предосторожности.
8. Вакцина отпускается без рецепта.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

9. Вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированная – иммунобиологический лекарственный препарат.
10. Вакцина вызывает формирование иммунитета к риимереллёзу водоплавающей птицы через 12-14 дней после повторного введения, который сохраняется не менее 8 недель. Вакцина безвредна, лечебными свойствами не обладает.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

11. Вакцина предназначена для профилактики риимереллёза водоплавающей птицы в хозяйствах, неблагополучных по данным заболеваниям.

12. Запрещено иммунизировать клинически больную и/или ослабленную птицу.

13. Вакцину вводят родительскому поголовью птицы за 45 дней до начала яйценоскости внутримышечно в бедро в дозе 1 мл двукратно: первый раз - за 45 суток до начала яйценоскости, второй раз спустя 14 дней после первой вакцинации.

Вакцинацию проводят с соблюдением общепринятых правил асептики, для инъекции используют только стерильные материалы и инструменты. Для каждой птицы используют отдельную иглу.

Перед применением флаконы с вакциной тщательно взбалтывают.

14. Симптомов риимереллёза, а также других патологических признаков при передозировке вакцины не выявлено.

15. Особенности поствакцинальной реакции при первичной и повторной вакцинации не установлено.

16. Не допускается проведение вакцинации птицы, чем за 45 дней до начала сезона яйценоскости.

17. Следует избегать нарушений схемы вакцинации, поскольку это может привести к снижению эффективности иммунопрофилактики риимереллёза птицы. В случае пропуска повторного введения вакцины необходимо провести иммунизацию как можно скорее.

18. При применении вакцины в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается. После введения вакцины у некоторых птиц возможно кратковременное повышение температуры тела или местная воспалительная реакция, исчезающая через 2-3 дня. Появляющаяся у отдельных птиц аллергическая реакция на введение препарата не может служить основанием для предъявления рекламации.

19. Вакцину не применяют в одном шприце с другими биопрепаратами и лекарственными средствами.

20. Продукты убоя от вакцинированной птицы используют без ограничений.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

21. При работе с вакциной следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными препаратами ветеринарного назначения.

22. Все лица, участвующие в проведении вакцинации должны быть одеты в спецодежду (резиновые сапоги, халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены очками закрытого типа. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

23. При попадании вакцины на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется промыть большим количеством водопроводной воды. При случайном введении препарата человеку место введения необходимо обработать 70%-ным раствором этилового спирта, обратиться в медицинское учреждение.

Вакцина является экспериментальным средством.

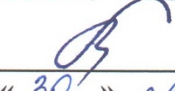
Приложение 7.

Этикетка для вакцины против риемереллёза водоплавающей птицы
инактивированной – «РеймерДак-ВИЭВ»

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН


А.Д. Забережный
« 30 » августа 2018 г.

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН


А.М. Гулюкин
« 30 » августа 2018 г.

Макет этикетки первичной (потребительской) упаковки
на иммунобиологический препарат

Вакцина против риемереллёза водоплавающих птиц инактивированная
«РеймерДак-ВИЭВ» (СТО 00496165-0004-2018)

Вакцина против риемереллёза водоплавающей птицы инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ»		
суспензия для инъекций		
Стерильно. Для ветеринарного применения Хранить в сухом тёмном недоступном для детей месте при температуре от 2 до 8 °С. Срок годности — 18 месяцев Применять внутримышечно согласно инструкции		
Отпускается без рецепта.		100 см³ (100 доз) Доза 1 см³ СТО 00496165-0004-2018
Серия №	Годна до:	 0 000000 000000
Дата выпуска:		
Производитель — ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Россия, 109428, г. Москва Рязанский проспект 24 к.1.		

Размер 9,24*13,36 мм

Масштаб 1:2

Приложение 8.

Акт клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ»

Утверждаю

Директор
ООО «Племптицезавод Благоварский»
Р.Р. Кутушев



АКТ

клинических испытаний безвредности, активности и эффективности вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ»

с. Языково
Республика Башкортостан, Благоварский
район

«29» июня 2018 г

Комиссия в составе главного ветеринарного врача ООО «Племптицезавод Благоварский» Карачурина И.Ф., старшего научного сотрудника лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Лаишевцева А.И., заведующего лабораторией микологии и антибиотиков имени А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Капустина А.В., аспиранта лаборатории микологии и антибиотиков имени А.Х. Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Якимовой Э.А. составили настоящий акт о том, что в период с 28.02.2018 г. по 29.06.2018 г. было проведено исследование безопасности, активности и эффективности применения «Вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инаktivированной «РеймерДак-ВИЭВ», экспериментальной серии №3, дата выпуска 02.2018 г., срок годности до 02.2019 г.

Для проведения исследований (безопасность вакцины в рекомендованной дозе при однократном и двукратном введении, безопасность введения вакцины в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, антигенная активность, эффективность применения вакцины на восприимчивых видах птиц) были сформированы несколько групп птиц подобранных по принципу аналогов, содержание и кормление которых было идентичным.

Приложение 9.

Диплом о награждении серебряной медалью коллектива ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ
РАН за разработку вакцины против риемереллёза водоплавающей птицы
инактивированной «РеймерДак-ВИЭВ» на «Золотой осени - 2018»

