

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Капустин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Смоленский Владимир Иванович – доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина», профессор кафедры зоогигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой.

Бакулин Валерий Александрович – доктор ветеринарных наук, профессор, «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – филиал ФНЦ ВНИТИП РАН, заведующий отделом вирусологии и опухолевых болезней птиц.

Ведущая организация: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект 24 к.1., тел.: 8(495)970-03-68.

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

Автореферат разослан " ____ " _____ 2020 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук**

И.Ю. Ездакова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Priya P.M. 2008; Shome R. 2004; Tsai H.J. 2005). Интенсивная технология производства приводит к одновременному содержанию большого количества птицы на ограниченной площади, что увеличивает вероятность возникновения и распространения инфекций (Sandhu TS. 2008; Hu Q. 2001; Han X. 2012). 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 – риермереллёз, возбудителем которого является бактерия семейства *Flavobacteriaceae*, рода *Riemerella*, вида *Riemerella anatipestifer*.

Борьба с риермереллёзом 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 риермереллёза 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 риермереллёза, как угрожающего для отечественного птицеводства заболевания, подчеркивается ФГБУ «ВНИИЗЖ», сотрудниками которого выявлены и описаны случаи инфекции в круп-

нейших утководческих предприятиях Российской Федерации и Европы (Потехин А.В. 2018).

Настоящая работа направлена на изучение вопросов, касающихся риимереллёза, 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 риимереллёз 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 (Лизун Р. 2015). 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 риимереллёза не разработана, отсутствуют данные по распространённости заболевания, не описаны особенности клинкоморфологического проявления заболевания, нет сведений о серотиповой принадлежности штаммов возбудителя риимереллёза, циркулирующих на территории РФ, не разработаны методические указания, регламентирующие последовательность лабораторной диагностики риимереллёза. 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 риимереллёза.

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 PHK 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 риерелллёза водоплавающих птиц инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ»», утвержденный 30.08.2018 г. ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН;

- разработана инструкция по ветеринарному применению инактивированной вакцины против риерелллёза 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 – риерелллёза. 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 риерелллёза 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 международных 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, утвержденные 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. anatispestifer*, 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. anatispestifer* 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная работа была выполнена в период 2016-2019 гг. на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук».

Изучение эпизоотической ситуации, клинические обследования птицы, патологоанатомические исследования, отбор материала для лабораторных исследований проводили на птицеводческих предприятиях 12 регионов РФ. Образцы материала от дикой перелетной птицы получены из Владимирской, Вологодской, Калужской, Псковской, Тульской, Ростовской, Рязанской, Тамбовской, Курской, Липецкой, Белгородской областей, Краснодарского и Ставропольского краев, республик Татарстан и Башкортостан.

В работе были использованы коллекционные и музейные штаммы бактерий из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, дифференциально-диагностические и элективные питательные среды, производства компаний «Himedia» и «Oxoid». Видовую идентификацию микроорганизмов проводили рутинными методами бактериологии и масс-спектрометрическим анализом MALDI-ToF. В качестве лабораторных и целевых животных использовались белые мыши, баран - донор, утки различных возрастных групп.

Эпизоотические данные и клинико-морфологическое проявление риимереллёза

Официальных статистических данных о распространенности риимереллёза в РФ нет, поэтому оценка реальной эпизоотической ситуации возможна лишь на основании собственных результатов.

При проведении эпизоотологического обследования 12 утководческих предприятий возбудитель риимереллёза выявлен в 8 из них.

Изоляты риимерелл были выделены в следующих регионах страны: №478 в Оренбургской области, №490 в Ростовской области, №512 в Алтайском крае, №513 в Краснодарском крае, №549 в Рязанской области, №566 в республике Башкортостан, №571 в республике Татарстан, №602 в Курганской области. Штамм №617 был выделен от свободноживущей

водоплавающей птицы, отстреленной в республике Башкортостан. Ввиду чего данные регионы стоит считать неблагополучными.

Также мы выяснили, что для риерелллёза свойственна сезонность. Так, на предприятиях, где сезон яйцекладки начинался в феврале-марте, с началом первых выводов, наступал отход молодняка. Наиболее подвержен инфекции молодняк в возрасте от 14 до 40 дней. Массовую гибель птицы с признаками риерелллёза старше 40 дней не фиксировали ни на одном из предприятий, отмечались лишь единичные случаи. Заболеваемость птицы колеблется в диапазоне 50-70%. Смертность молодняка составляет 10,5-67,5%, но она может контролироваться применением антибиотиков широкого спектра действия.

Установлено, что заболевание у уток и гусей может протекать в четырёх различных формах: респираторная форма проявлялась глазными и носовыми истечениями (казеозный или фибринозный синусит), часто гнойного характера, кашлем и чиханием; септическая форма характеризовалась бактериемией с нарастающей интоксикацией организма; при желудочно-кишечной форме отмечали диарею с характерным зеленоватым оттенком фекалий; нервную форму заболевания фиксировали достаточно редко, у более взрослой птицы. При этой форме отмечались произвольные некоординированные движения, искривление шеи, тремор головы, судороги, плавательные движения конечностей в спинном положении. Вне зависимости от формы течения, общими признаками инфекции являлись слабость, снижение подвижности, отказ от корма, повышение температуры тела.

При внешнем осмотре тушек павшей птицы было выявлено уплотнение кожных покровов и подкожной клетчатки, развитие дерматита. В области поражения наблюдали интенсивное отшелушивание частиц кожи в виде большого количества перхоти и отёк подкожной клетчатки в виде студенистого инфильтрата. Основные поражения органов брюшной полости: застойная гиперемия печени и почек с явлениями белковой (зернистой) или жировой дистрофии; фибринозный или фибринозно-некротический перигепатит; увеличение селезёнки, сопровождающееся отёком, и иногда, очаговым некрозом. У птицы в возрасте старше 4 недель выявляли фибринозный периспленит. Исследование органов пищеварительной системы показало преобладание признаков катарального

воспаления желудка и кишечника с инъецированием сосудов и с кровоизлияниями. При вскрытии грудной полости фиксировали фибринозный перикардит и эпикардит, дряблость сердечной мышцы с явлениями дистрофии и отложением фибрина, острый интерстициальный отёк лёгких, серозную пневмонию, серозно-фибринозный плеврит, фибринозную бронхопневмонию, трахеит, фибринозный аэросаккулит.

У взрослых переболевших особей отмечено развитие казеозного или фибринозного сальпингита. Риимереллёз у птиц может сопровождаться хроническим артритом, с эрозией суставного хряща. У более взрослой птицы, особенно в возрасте 40-50 дней, нередким явлением был гнойный синовит.

Разработка схемы лабораторной диагностики риимереллёза

Поскольку в настоящее время риимереллёз не отнесен в РФ к особо опасным заболеваниям водоплавающей и сельскохозяйственной птицы, а также не включен в список инфекций, отслеживаемых в рамках государственного эпизоотического мониторинга, то методические указания, регламентирующие проведение лабораторно-диагностических исследований на риимереллёз, отсутствуют. В связи с этим, нами были предприняты меры по разработке и апробации методических указаний, в дальнейшем используемые на практике. Схема проведения диагностических исследований отражена на рисунке № 1.



Рисунок 1 - Схема проведения бактериологического исследования клинического и патологического материала для подтверждения диагноза риимереллёз

Использование данной схемы диагностики позволило нам выделить из секционного материала 9 штаммов *Riemerella anatipestifer* и 2 - *Riemerella columbina*.

Характеристика изолятов *Riemerella anatipestifer*

Культуры *R. anatipestifer* на кровяном агаре в присутствии 5% CO₂ и температуре 37°C, через 24 часа, образуют не пигментированные гладкие колонии размером 0,5-1,0 мм. Через 48 часов культивирования размер колоний достигает 2-5 мм, вплоть до формирования сплошного газона. Гемолитическая активность отсутствовала у всех культур. При микроскопии клетки возбудителя имеют форму грамотрицательных коккопалочек.

При посеве на полужидкий агар и культивировании при соответствующих условиях, на 48 ч культивирования наблюдали незначительный рост культуры, вдоль посева, сделанного уколом петлём.

На жидких средах рост реймерелл удалось получить лишь с использованием триптиказо-соевого бульона, концентрация на котором составила $2,5 \cdot 10^9$ м. к. /см³ за 24 часа культивирования на шейкере.

Биохимический профиль реймерелл представлен в таблице № 1.

Таблица 1 – Биохимические свойства изолятов реймерелл, 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
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пигмент на кровяном агаре	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Разжижение желатина	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	-	+	-
САМР тест	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Уреаза	+	+	-	+	+	-	+	-	+
Образование индола	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Аргининдекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b- Глюкозидаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a- Галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a- Мальтозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Эстераза	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Валин ариламидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Трипсин	-	-	+	-	-	-	-	-	-
a-Химотрипсин	+	-	+	+	+	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ферментация углеводов									
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Мальтоза	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Манноза	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Декстрин	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Как видно из представленных в таблице № 1 данных, все изоляты риимерелл имеют типичные для вида свойства, но они отличаются между собой, в частности, в реакции Фогес-Проскауэра, CAMP тест, уреазе, индоле, трипсине, а-химотрипсине, а также возможности ферментации трегалозы, мальтозы, маннозы.

Антибиотикорезистентность штаммов *Riemerella anatipestifer*

Для определения оптимальной антибактериальной терапии риимереллёза обязательным условием является определение чувствительности культур риимерелл к антибиотикам различных групп. Антибиотикограмма эпизоотических культур реймерелл, отражена на графическом рисунке № 2.

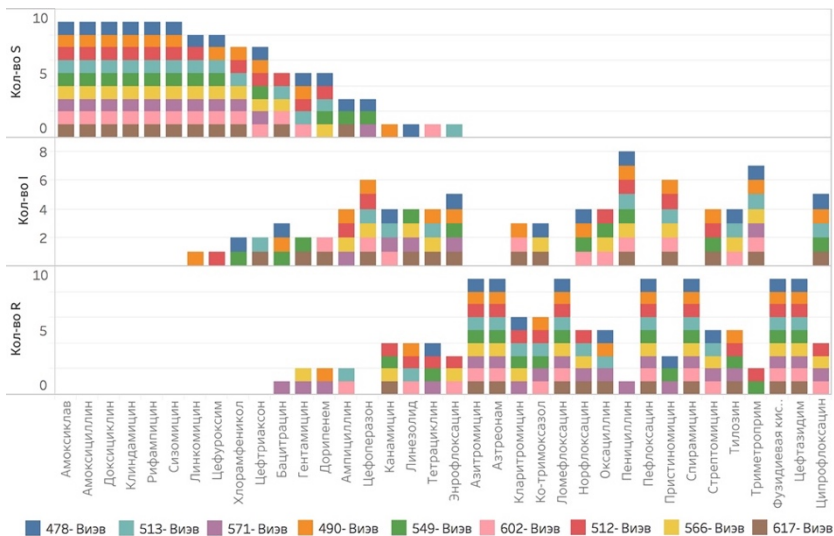


Рисунок 2 – Антибиотикочувствительность культур *Riemerella anatipestifer* выделенных на территории РФ

Согласно полученным результатам, наиболее эффективными антибактериальными средствами в отношении риимерелл, циркулирующих на территории РФ являются: сизомицин, рифампицин, клиндамицин, амок-

сиклав, амоксициллин, доксициклин, линкомицин, цефуроксим, хлорамфеникол, цефтриаксон, что позволяет рекомендовать данные антибиотики для лечения птиц от риермереллёза в промышленных условиях.

Патогенные и вирулентные свойства изолятов

Riemerella anatipestifer

Стандартная методика определения патогенности бактерий на белых мышах оказалась непригодной для рассматриваемого возбудителя, так как выделенные штаммы не вызвали гибель животных. Использование 10-ти дневным мускусных утят для данных целей оказалось более оправдано. Внутримышечное введение возбудителя в концентрации $3 \cdot 10^9$ м. к. /см³, и объеме 0,5 мл приводит к гибели подопытных утят, с последующим выделением инфицирующей культуры из сердца (воспроизведение триады Коха). Гибель утят наступала через 24-96 ч после инфицирования.

С целью определение степени патогенности исследуемых культур, выраженной в показателе LD₅₀, мы заражали 10-ти дневных утят (по 4 головы на каждое разведение), путём внутримышечного инфицирования суспензией бактериальных клеток с десятикратной разницей концентрации (10^6 - 10^9 м. к.), продолжительность наблюдения составляла 14 дней. В результате были установлены следующие значения показателя LD₅₀: №478 - $1,77 \cdot 10^8$; №490 - $8,25 \cdot 10^7$; №512 - $1,61 \cdot 10^8$; №513 - $4,95 \cdot 10^8$; №549 - $2,20 \cdot 10^7$; №566 - $5,31 \cdot 10^7$; №571- $1,74 \cdot 10^8$; №602 - $1,08 \cdot 10^9$; №617 - $1,99 \cdot 10^8$ мкр. кл. соответственно.

Клинические признаки болезни и патоморфологические изменения после инфицирования соответствовали данным, полученными нами ранее. При бактериологическом исследовании крови из сердца утят во всех случаях выделены культуры *R. anatipestifer*, что свидетельствует о септическом характере заболевания.

Анализ полученных данных позволяет утверждать, что штаммы №549, №566 и №490 являются наиболее вирулентными, поэтому они в дальнейшем использовались нами как производственные при разработке иммунобиологических средств.

Получение пилотной серии вакцины против риесмереллёза водоплавающей птицы

Для определения антигенных и иммуногенных свойств, выделенных нами изолятов *R. anatipestifer*, были изготовлены инактивированные вакцины из каждого штамма. Образцы экспериментальных серий препаратов были получены по стандартной методике: получение бактериальной массы, инаktivация, концентрирование, компоновка, расфасовка и контроль. Таким образом, нами были изготовлены 9 моновакцин, где в качестве адьюванта использовали гидроокись алюминия (ГОА). Концентрация антигена в вакцинах составляла 3 млрд. м. к./см³, способ введения - внутримышечно двукратно с интервалом 14 дней.

Изучение антигенных свойств штаммов риесмерелл

Для опыта было сформировано 9 опытных и 1 контрольная группа 10-ти дневных утят, по 6 голов в каждой. Все птицы, используемые в опыте, были подобраны по принципу аналогов. Каждую группу птиц подвергали двукратной иммунизации соответствующей моновакциной с интервалом 14 дней. Объём вводимой суспензии составлял 0,5 см³. Определение титров антител проводили в реакции агглютинации на стекле. Постановка реакции агглютинации проводилась с гомологичным штаммом.

Средние значения титров антител после двукратной вакцинации составили: №478 - 1:133,33±41,31; №490 - 1:120,00±43,81; №512 - 1:173,33±117,7; №513 - 1:160,00±87,63; №549 - 1:120,00±43,81; №566 - 1:133,33±41,31; №571 - 1:93,33±32,65; №602 - 1:146,67±93,52; №617 - 1:120,00±43,81 т.е. все штаммы риесмерелл обладают антигенной активностью, находящейся в диапазоне среднего значения 1:93 - 1:173.

Дополнительно была изучена перекрёстная антигенность. Для этого реакцию агглютинацию ставили не только с гомологичными культурами, но и гетерологичными. Результаты приведены в таблице № 2.

Таблица 2 – Перекрёстная антигенная активности штаммов риесмерелл в реакции агглютинации (среднее значение по 5 образцам)

Штаммы	Сыворотка крови								
	478	490	512	513	549	566	571	602	617
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
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	-	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
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, позволяют сделать вывод, что на территории РФ, а именно в обследованных птицеводческих предприятиях циркулирует как минимум три серотипа *R. anatipestifer*, не обладающих перекрёстной антигенной активностью.

Определение иммуногенных свойств *Riemerella anatipestifer*

Иммуногенность моновакцин изучали путем заражения ранее вакцинированных утят гомологичными и гетерологичными штаммами риемерелл в дозе 5 LD₅₀. Заражение проводили на 15 день после повторной вакцинации и отбора образцов крови для серологических исследований. Результаты опыта приведены в таблице № 3.

Таблица 3 – Иммуногенность штаммов риемерелл при заражении гомологичными и гетерологичными штаммами

Вакцина	Номера птиц	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 определяли

Проведённый опыт позволил нам доказать возможность вакцинопрофилактики риемереллёза водоплавающей птицы, т.к. вакцинированная птица выжила после заражения пятикратной летальной дозой штамма гомологичного серотипа. Все контрольные утята погибли после заражения. Корреляция данных таблицы №2 и №3 позволяет говорить о минимальном защитном уровне антител при риемереллёзе, который должен быть не менее 1:106.

Клинические испытания экспериментальной серии вакцины против риемереллэза на птицеводческом предприятии

Испытания вакцины проводилось в птицеводческом предприятии республики Башкортостан, в период с 28.02.2018 г. по 29.06.2018 г.

С целью определения безвредности и антигенной активности были сформированы несколько групп птиц, подобранных по принципу аналогов (таблица № 4).

Таблица 4 - Клинические испытания вакцины против приемереллэза водоплавающей птицы инактивированной «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	Серьезные 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

При однократном и двукратном применении препарата птице в возрасте 110 и 124 дней, в рекомендованной дозе 1 см³, а также в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, установлено отсутствие системных изменений физиологического состояния организма. Из местных реакций было зафиксировано развитие хромоты, которая самостоятельно и без каких-либо последствий проходила спустя 24-48 часов после применения препарата.

Для определения влияния препарата на сохранность молодняка, полученного от вакцинированного родительского поголовья, птицам опытной группы его вводили в соответствии со схемой вакцинации двукратно. Для чистоты эксперимента, птице контрольной группы, вводили стерильный физиологический раствор по той же схеме. Контроль за птицей устанавливали в течение 3 месяцев, в том числе во время периода яйцекладки. Критерием оценки являлось отсутствие у вакцинированных птиц сниже-

ния сохранности, а также отсутствие у полученного молодняка каких-либо врождённых уродств.

Среди птиц опытной группы из местных реакций было зафиксировано развитие хромоты, которая самостоятельно проходила на 2-3 день, без каких-либо вмешательств и образование небольшой отёчности в области инъекции с повышением местной температуры. Отёк самостоятельно рассасывался через 48-72 ч, температура нормализовалась за 24 ч.

В результате проведенной вакцинации сохранность молодняка, полученного от уток опытной группы, составила 96,32%, сохранность молодняка контрольной группы - 93,76%.

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 РА. Получение сыворотки крови производили выборочно от 10 голов птиц первой группы (доза 1 см³) и второй группы (доза 2 см³) перед первой иммунизацией, перед второй и через 14 дней после второй вакцинации. Полученные результаты исследования приведены в таблице № 5.

Таблица 5 – Антигенная активности препарата «РеймерДак-ВИЭВ»

Группа опытная №1 (доза 1 см ³)											
Период	Титр 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 ±4,83
После 1-ой вакцинации	1:80	1:80	1:40	1:80	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:68 ±19,32
После 2-ой вакцинации	1:160	1:160	1:80	1:160	1:160	1:160	1:320	1:80	1:160	1:160	1:160 ±65,31
Группа опытная №2 (доза 2 см ³)											
Период	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 ±4,83
После 1-ой вакцинации	1:80	1:40	1:80	1:40	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80 ±32,65
После 2-ой вакцинации	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320	1:160	1:160	1:192 ±67,46

Как видно из данных, представленных в таблице № 5, титры антител к риимереллэзу птиц первой и второй опытных групп, двукратно вакцинированных разработанным биопрепаратом, существенно увеличились на 14 день 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 титров антител. Ввиду этого стоит считать, что оптимальная вакцинальная доза должна составлять 1 см³ (3 млрд. м. к. см³), что позволяет получить средний титр антител при двукратной иммунизации 1:160-1:192.

Выводы

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

2) Разработанная схема лабораторной диагностики риимереллэза водоплавающих птиц, регламентирующая порядок отбора и пересылки образцов материала, последовательность бактериологического исследования и принципы постановки диагноза на риимереллэз водоплавающей птицы, позволила выделить и идентифицировать 88 изолятов *Riemerella anatipestifer* и *Riemerella 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, док-

сициклину, линкомицину, цефуроксиму, хлорамфениколу, цефтриаксону; резистентны к азитромицину, азтреонаму, ломефлоксацину, пефлоксацину, спирамицину, цефтазидиму.

5) Установлено, что лабораторной моделью для экспериментального воспроизведения риермереллёза являются птицы естественно-восприимчивых видов, при этом гибель утят 10-ти дневного возраста при внутримышечном заражении наступает в течение 24-96 часов. Величина LD_{50} культур риермерелл 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 риермереллёза 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 LD_{50} . 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 риермереллёза 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 риермереллёза в неблагополучных предприятиях.

Практическое использование результатов исследований

Результаты выполненной научно-исследовательской работы обобщены, систематизированы и заложены в основу разработанных методических указаний «Диагностика риермереллёза водоплавающих птиц», одоб-

ренные 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 риермереллёза водоплавающих птиц.

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 риермереллеза водоплавающих птиц инаktivированная «РеймерДак-ВИЭВ», позволяющий проводить всестороннюю оценку качества выпускаемых иммунобиологических средств против риермереллёза.

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

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Ветеринарным специалистам птицеводческих предприятий и частных индивидуальных хозяйств рекомендуется проводить мониторинг риермереллёза, 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 риермереллёза, использовать новые схемы и методы, предложенные в данной работе.

При проведении лабораторных диагностических исследований для индикации и идентификации *R. anatipestifer*, в том числе бактерионоситель-

ства, 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 иммунной активности препаратов.

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. *Лаишевцев А.И., **Якимова Э.А.**, Капустин А.В. Опыт разработки первой отечественной вакцины против риеме́реллэза // Ветеринария. - 2018. – № 8. С. 24-29.
2. *Данилюк А.В., Митрикова А.Д., **Якимова Э.А.**, Капустин А.В. Рационализация использования антибактериальных средств в промышленном животноводстве и птицеводстве. Бактериофаги и органические кислоты как средство эффективной борьбы с бактериальными инфекциями // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2018. – № 1 (25). – С. 124-128.
3. ***Якимова Э.А.** Антибиотикорезистентность возбудителя риеме́реллэза водоплавающей птицы // Ветеринария и кормление. – 2018. – № 7. С. 25-28.
4. **Laishevtsev A.I., Kapustin A.V., **Yakimova E.A.**, Danilyuk A.V., Gulyukin A.M., Belimenko V.V. Necrotic enteritis of birds // В сборнике: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – С. 022075.
5. **Burlakov S.V., Burlakova G.I., Kapustin A.V., **Yakimova E.A.**, Laishevtsev A.I. The relevance of salmonellosis risk control in the population of turkeys of the Russian Federation // В сборнике: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – С. 022062.
6. **Yakimova E.A.**, Kapustin A.V., Smirnov D.D., Savinov V.A., Laishevtsev A.I., Plygun S.A. The participation of wild migratory birds in the spread of riemerellosis and the microbial biocenosis of the wild ducks // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2019. – № 9 (93). – С. 88-95.
7. **Якимова Э.А.**, Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Смирнов Д.Д., Савинов В.А., Забережный А.Д., Гулюкин А.М., Белименко В.В., Петкович Д.Д. Диагностика риеме́реллэза водоплавающих птиц // Методические указания. – 2019. – С. 15.
8. * **Якимова Э.А.**, Савинов В.А., Смирнов Д.Д., Лаишевцев А.И., Капустин А.В., Осипов О.В. Антибактериальная терапия риеме́реллэза уток // Ветеринарный врач. – 2019. - №6. С. 65-72.
9. ****Yakimova E.A.**, Kapustin A.V., Belimenko V.V., Gulyukin A.M., Laishevtsev A.I. Microbiological screening of bacterial infections in Russian duck breeding enterprises // В сборнике: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2020. – С. 022075.

*- издания, рекомендованные ВАК РФ

** - издания, перечня Scopus