

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ДНК ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ПРОВЕДЕННЫХ В 2017 Г.

Д. Н. Федосеева¹, Е. В. Аронова², А. А. Варенцова³, А. А. Елсукова⁴, Али Мазлум⁵, Д. В. Шарыпова⁶, Н. Н. Власова⁷, А. С. Иголкин⁸

¹ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: fedoseeva@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: aronova@arriah.ru

³ Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: varentsova@arriah.ru

⁴ Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: elsukova@arriah.ru

⁵ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ali.mazloum6@gmail.com

⁶ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: sharipova@arriah.ru

⁷ Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁸ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты исследований биоматериала от домашних свиней и диких кабанов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по обнаружению генома вируса африканской чумы свиней, проведенных на базе ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (г. Владимир). В 2017 г. в рамках государственного лабораторного мониторинга исследовано 8500 проб, поступивших из 44 субъектов Российской Федерации, среди которых выявлены 504 пробы, содержащие геном вируса африканской чумы свиней. В 2017 г. впервые зарегистрировано возникновение очагов инфекции в Уральском и Сибирском федеральных округах РФ. Проведенные исследования и сохраняющееся длительное неблагополучие по африканской чуме свиней территорий РФ подтвердили актуальность дальнейшего надзора в популяциях восприимчивых животных. Разработка, организация и выполнение программы надзора распространения заболевания в дикой фауне остается первоочередной задачей. Для своевременного купирования очагов инфекции на уровне регионов требуются составление и реализация графиков отбора проб с равномерным распределением по времени отбора биоматериала и направления отобранных образцов в исследовательские лаборатории.

Ключевые слова: африканская чума свиней, мониторинговые исследования, геном, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

UDC 619:578.842.1:616-076

ANALYSIS OF MONITORING STUDIES ON AFRICAN SWINE FEVER VIRUS DNA DETECTION CARRIED OUT IN 2017

D. N. Fedoseyeva¹, Ye. V. Aronova², A. A. Varentsova³, A. A. Yelsukova⁴, Ali Mazloum⁵, D. V. Sharypova⁶, N. N. Vlasova⁷, A. S. Igolkin⁸

¹ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: fedoseeva@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: aronova@arriah.ru

³ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: varentsova@arriah.ru

⁴ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: elsukova@arriah.ru

⁵ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ali.mazloum6@gmail.com

⁶ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sharipova@arriah.ru

⁷ Chief Researcher, Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁸ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

SUMMARY

The paper describes the results of testing of biomaterial from domestic pigs and wild boars by real-time PCR used for African swine fever virus genome detection, carried out in the FGBI "Federal Centre for Animal Health" (Vladimir). In 2017 8,500 samples from 44 subjects of the Russian Federation were tested within the framework of the state laboratory monitoring. African swine fever virus genome was detected in 504 samples. In 2017 ASF outbreaks were registered in the Urals and Siberian Federal Districts of the RF for the first time. The conducted research and persistent ASF infection in the territory of the RF have demonstrated the need for further surveillance in the populations of susceptible animals. Development, organization and implementation of the program for ASF spread surveillance in wild fauna remains a high priority. It is necessary to create and implement sampling schedules with uniform sampling of biomaterial and submission of the collected samples to the research laboratories for timely ASF outbreak containment at the regional level.

Key words: African swine fever, monitoring studies, genome, real-time polymerase chain reaction.

ВВЕДЕНИЕ

Продовольственная безопасность Российской Федерации является одним из главных направлений обеспечения национальной безопасности страны в среднесрочной перспективе [4]. В рамках реализации данного направления предусмотрен комплекс мероприятий по развитию отраслей животноводства. В их число входит улучшение эпизоотической ситуации по особо опасным болезням животных, в том числе по африканской чуме свиней (АЧС) [3].

Предотвращение распространения инфекции и оздоровление территории страны напрямую зависят от эффективности реализуемой системы надзора [1].

Основными целями системы надзора являются:

- 1) доказательство отсутствия или выявления присутствия болезни/инфекции;
- 2) установление тенденции развития болезни в восприимчивых популяциях;
- 3) раннее выявление экзотических и эмерджентных болезней [12].

С начала эпизоотии АЧС в 2007 г. и по 2018 г. на территории РФ было зарегистрировано 1274 вспышки АЧС, из которых более 50% зафиксировали в популяции домашних свиней из небольших хозяйств (ЛПХ, КФХ, ИП) [9]. До 2011 г. очаги инфекции в основном отмечали на территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, где возникла первичная эндемичная по АЧС зона «юг». В 2012–2013 гг. болезнь регистрировали как в Южном, так и в Центральном федеральном округе, где в результате образовалась вторая эндемичная по АЧС зона – «север».

В дальнейшем тенденция распространения инфекции с вовлечением в эпизоотический процесс новых территорий сохранилась [9]. Так, с 2015 г. начался очередной этап эпизоотии АЧС – нарастание третьей волны эпизоотического процесса, – сопровождающийся значительным увеличением числа очагов болезни и вовлечением значительного количества новых регионов. В итоге за 10 лет неблагополучия АЧС охватила 43 региона европейской части РФ [8].

На сегодняшний день риск дальнейшего распространения инфекции остается высоким, что связано со следующими факторами: 1) случаи межхозяйственной поставки живых животных (свиней) и продукции свиноводства из инфицированных зон в свободные от АЧС территории при условии задержек действий в цепи «диагноз – карантин»; 2) частичное или полное отсутствие мер биобезопасности в небольших хозяйствах (ЛПХ, КФХ, ИП) ввиду финансовой несостоятельности или непонимания, их уклонение от мероприятий надзора; 3) отсутствие действующих превентивных программ на территории ряда субъектов РФ; 4) перемещение живых животных и свиноводческой продукции без ветеринарных сопроводительных документов (ВСД); 5) диффузное распространение инфекции как внутри неблагополучного региона, так и за его пределы путем миграции дикого кабана (внутрирегиональный фактор) [8].

Важным звеном в мероприятиях надзора остается оперативное проведение лабораторных исследований проб биологического материала (патологического материала и сывороток крови) для выявления вируса АЧС или наличия его генетического материала, а также антител к возбудителю лабораториями (испытательными центрами), входящими в систему органов и учреждений государственной ветеринарной службы РФ, или

лабораториями (испытательными центрами), аккредитованными в национальной системе аккредитации [2].

В настоящее время практика лабораторных исследований указывает, что по результативности полимеразная цепная реакция остается методом «первого выбора» для диагностики АЧС [1].

Целью работы был анализ результатов мониторинговых исследований по выявлению ДНК вируса АЧС, проведенных в референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом молекулярно-генетических исследований служили биологический материал от домашних свиней и диких кабанов и пробы изделий свиного происхождения, поступившие в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из различных регионов РФ в течение 2017 г.

Выделение суммарной ДНК осуществляли методом нуклеосорбции с помощью коммерческого комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио», г. Москва).

Постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с применением коммерческой тест-системы «АЧС» для выявления вируса АЧС методом ПЦР-РВ (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителей [5, 6].

Постановку ПЦР-РВ осуществляли в амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Германия). Учет результатов реакции проводили, анализируя кривые накопления флуоресцентного сигнала для каждой пробы с помощью программного обеспечения прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с приказом Россельхознадзора от 30 декабря 2016 г. № 1004 (с учетом доп. и изм. 2017 г.) «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО на 2017 год» (<http://www.refcenter57.ru/files/1004.pdf>) сотрудниками референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» проведены исследования проб биологического материала от домашних свиней и диких кабанов, а также изделий свиного происхождения.

В 2017 г. исследовано 8500 проб (патологический материал, кровь и сыворотка от домашних свиней и диких кабанов, изделия свиного происхождения) из 44 субъектов РФ (табл. 1). Исследования проводили как в рамках активного мониторинга, так и с целью подтверждения диагноза АЧС, поставленного региональными ветеринарными лабораториями и подведомственными Россельхознадзору межрегиональными ветеринарными лабораториями субъектов РФ.

В связи с напряженной эпизоотической ситуацией наибольшее количество проб для исследования направлено из Республики Крым (914 проб) и Владимирской области (778 проб). Наименьшее количество проб поступило из Республики Дагестан, Нижегородской и Тюменской областей (табл. 1).

Пик поступления проб пришелся на сентябрь и декабрь 2017 г. – 1411 и 1884 пробы соответственно, что в первую очередь связано с необходимостью завершения запланированных на год противоэпизоотических

Таблица 1
Распределение по регионам РФ проб, поступивших для исследования
в референтную лабораторию по АЧС ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г.

№ п/п	Регион РФ	Кол-во проб, шт.		№ п/п	Регион РФ	Кол-во проб, шт.	
		общее	из них положительных			общее	из них положительных
1	Архангельская обл.	92	0	23	Новгородская обл.	199	0
2	Астраханская обл.	92	0	24	Омская обл.	106	97 (91,51%)
3	Белгородская обл.	212	0	25	Оренбургская обл.	100	0
4	Брянская обл.	100	0	26	Орловская обл.	91	12 (13,19%)
5	Владимирская обл.	778	52 (6,68%)	27	Пензенская обл.	200	0
6	Волгоградская обл.	206	2 (0,97%)	28	Псковская обл.	100	0
7	Вологодская обл.	750	0	29	Ростовская обл.	84	4 (4,76%)
8	Воронежская обл.	200	0	30	Рязанская обл.	185	0
9	Забайкальский край	69	0	31	Самарская обл.	95	0
10	Ивановская обл.	472	0	32	Смоленская обл.	100	0
11	Иркутская обл.	11	5 (45,46%)	33	Ставропольский край	195	0
12	Калининградская обл.	512	7 (1,37%)	34	Тверская обл.	100	0
13	Калужская обл.	200	0	35	Тульская обл.	100	0
14	Кировская обл.	223	0	36	Тюменская обл.	8	8 (100,00%)
15	Костромская обл.	313	0	37	Челябинская обл.	17	11 (64,71%)
16	Краснодарский край	88	35 (39,77%)	38	Ярославская обл.	103	0
17	Курганская обл.	21	3 (14,29%)	39	Респ. Башкортостан	300	0
18	Курская обл.	100	0	40	Респ. Дагестан	9	0
19	Ленинградская обл.	60	0	41	Респ. Крым	914	262 (28,67%)
20	Липецкая обл.	200	0	42	Респ. Мордовия	304	0
21	Московская обл.	70	0	43	Удмуртская Респ.	200	0
22	Нижегородская обл.	6	6 (100,00%)	44	Чувашская Респ.	205	0

мероприятий в регионах. На увеличение количества проб в II–IV кварталах отчетного периода, вероятно, также влияли: 1) природный фактор, обуславливающий рост заболеваемости АЧС в связи с биологическими особенностями животных (увеличение внутри- и межпопуляционных контактов в период гона, перегруппировки стад у диких кабанов и т. п.); 2) антропогенный фактор, также приводящий к росту вспышек в весенне-летний период (активное приобретение населением поросят для откорма, особенности содержания свиней в незащищенных хозяйствах (ЛПХ, КФХ) и др.) (рис. 1).

В результате проведенных исследований выявлено 504 пробы, содержащие ДНК вируса АЧС (5,93% от общего количества проб). Указанные пробы поступили из следующих субъектов РФ: Владимирской, Волгоградской, Иркутской, Калининградской, Курганской, Нижегородской, Омской, Орловской, Ростовской, Тюменской, Челябинской областей, Краснодарского края и Республики Крым (рис. 2). Учитывая данные по эпизоо-

Рис. 1. Распределение проб, поступивших для исследования, по месяцам 2017 г.

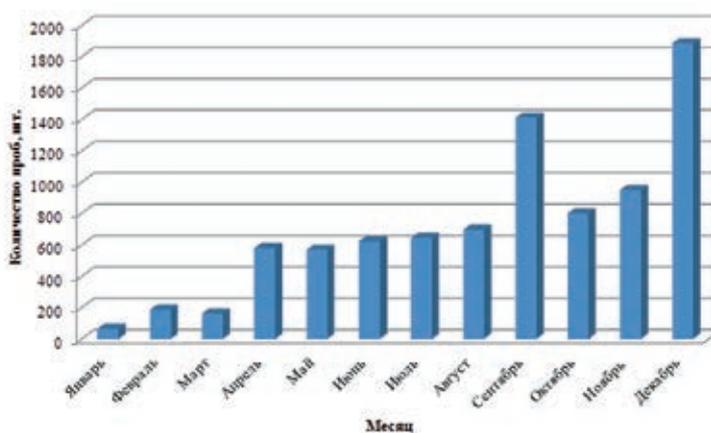




Рис. 2. Распределение по регионам проб, содержащих геном вируса АЧС

тической ситуации за предыдущие годы и полученные в представленной работе результаты, можно сделать вывод, что в трех регионах сохраняется длительное неблагополучие по АЧС: в Краснодарском крае вспышки регистрируют с 2008 г., в Ростовской области – с 2009 г. и в Волгоградской – с 2010 г. На территории Орловской области очаги инфекции ежегодно регистрируют с 2014 г. Первое сообщение об АЧС из Нижегородской области поступило в 2011 г. (выявлено два очага среди домашних свиней). Следующие четыре года регион сохранял благополучие по АЧС, но в 2016 г. произошел вторичный занос возбудителя инфекции. На территории Владимирской области вспышки болезни регистрировали в 2013, 2015 и 2016 гг. [11].

В 2017 г. АЧС впервые была зарегистрирована на территории Иркутской, Омской, Челябинской, Калининградской, Тюменской и Курганской областей и, согласно данным Россельхознадзора, в Ямало-Ненецком автономном округе и Красноярском крае [11]. Учитывая территориальную отдаленность регионов, входящих в состав Сибирского и Уральского федеральных округов, от ранее неблагополучных по АЧС субъектов РФ, можно предположить, что занос возбудителя АЧС на их территорию произошел с подконтрольными госветнадзору товарами [10].

Наибольший процент проб, в которых выявили геном вируса АЧС, пришелся на Тюменскую (100,00%), Нижегородскую (100,00%) и Омскую (91,51%) области (табл. 1).

Из 8500 проб, направленных на ПЦР-исследование, 110 составили пробы патологического материала от диких кабанов (1,18%), которые поступили из шести регионов Центрального, Южного и Северо-Западного федеральных округов РФ с высокой плотностью популяций данных животных (табл. 2). Согласно сопроводительным документам, пробы были отобраны от отстреленных животных и от трупов кабанов, найденных в лесных массивах.

В результате проведенных лабораторных исследований в 17 (15,50%) из 110 проб патологического материала от диких кабанов обнаружен геном вируса АЧС.

Согласно ранее опубликованным данным, доля неблагополучия по АЧС в дикой фауне составляет около 40% от общего числа вспышек [8]. Для признания страны благополучной по АЧС необходимы доказательства отсутствия циркуляции вируса в популяции восприимчивых животных (в том числе диких кабанов), основанные на результатах мониторинговых исследований [7].

В связи с этим дальнейший надзор за популяциями восприимчивых к АЧС животных (домашних свиней и диких кабанов) остается актуальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований, а также сохраняющееся длительное неблагополучие по АЧС территорий РФ указывают на необходимость продолжения мониторинговых исследований с использованием прямых методов диагностики (ПЦР). Поскольку основное количество проб биоматериала по государственному заданию поступает лишь к концу года, это может приводить к искажению реальной картины распространения болезни и задержке в принятии своевременных мер по купированию очагов инфекции. В связи с этим на уровне регионов требуются составление и своевременная реализация графиков отбора проб с равномерным распределением по времени отбора биоматериала и направления отобранных образцов в исследовательские лаборатории.

Результаты исследований позволили выявить 188 очагов АЧС как в новых, ранее благополучных регионах Сибирского и Уральского федеральных округов, так и в регионах, имеющих статус длительного неблагополучия по АЧС (Краснодарский край, Ростовская и Волгоградская области). Полученные данные коррелируют со сделанным ранее специалистами ИАЦ Управления ветнадзора прогнозом распространения АЧС в РФ [8].

Таблица 2
Результаты исследования проб патологического материала от диких кабанов с использованием ПЦР-РВ

№ п/п	Регион РФ	Общее количество проб, шт.	Количество проб, содержащих геном вируса АЧС, шт.
1	Белгородская обл.	2	2 (100%)
2	Брянская обл.	48	0
3	Владимирская обл.	13	1 (7,69%)
4	Волгоградская обл.	1	1 (100,00%)
5	Калининградская обл.	16	12 (75,00%)
6	Республика Крым	30	1 (3,33%)
Всего		110	17

Дикие кабаны являются дополнительной группой риска при АЧС, так как сохраняется возможность выноса возбудителя в незащищенные популяции домашних свиней. Следовательно, необходима разработка и выполнение программы надзора распространения заболевания в дикой фауне. Наличие инфицированных кабанов предопределяет необходимость систематического проведения мониторинговых исследований, охватывающих места обитания этих животных. Пристального внимания заслуживают ареалы, пересекающиеся с деятельностью человека, в том числе находящиеся в непосредственной близости к населенным пунктам, являющиеся излюбленным местом охоты, собирательства и отдыха людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ проведения лабораторных исследований по ряду вирусных болезней свиней на территории России в 2011–2017 гг. / А. А. Шевцов, О. Н. Петрова, С. Г. Ремыга [и др.] // *Ветеринария сегодня*. – 2018. – № 1. – С. 42–48.
2. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидации очагов африканской чумы свиней / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – М., 2016. – 16 с.
3. Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/70210644/paragraph/1188610:0>.
4. Доктрина продовольственной безопасности Российской Федерации: утв. Указом Президента Российской Федерации № 120 от 30.01.2010. – URL: <http://legalacts.ru/doc/ukaz-prezidenta-rf-ot-30012010-n-120/>.
5. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В». – М.: ООО «НекстБио», 2012. – 14 с.
6. Инструкция по применению тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции. – М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017. – 24 с.
7. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 2. Рекомендации по болезням Списка МЭБ и другим важным для международной торговли болезням / OIE. – 25-е изд. – Paris, France: OIE, 2016. – Гл. 15.1. – С. 751–756.
8. Прогноз до 2025 г. по распространению африканской чумы свиней в России / А. К. Караулов, А. А. Шевцов, О. Н. Петрова [и др.] // *Ветеринария и кормление*. – 2018. – № 3. – С. 12–14.
9. Прогноз по африканской чуме свиней в Российской Федерации на 2016 год / О. Н. Петрова, Ф. И. Коренной, Н. С. Бардина [и др.]. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016. – 32 с.

10. Профилактика АЧС / Управление Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) по Новосибирской области. – URL: <http://rshn-nso.ru/proflaktika-achs>.

11. Текущая эпизоотическая ситуация по африканской чуме свиней. Хронология / Россельхознадзор. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/asf/chronology/>.

12. World Organisation for Animal Health (OIE). – URL: <http://www.oie.int>.

REFERENCES

1. Analysis of laboratory studies on a number of viral swine diseases in Russia in 2011–2017. A. A. Shevtsov, O. N. Petrova, S. G. Remyga [et al.]. *Veterinary Science Today*. 2018; 1: 42–48 (in Russian).
2. Veterinary rules of implementation of preventive, diagnostic, restrictive and other actions, imposition and lifting of the quarantine and other restrictions aimed at ASF spread prevention and ASF eradication. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. M.; 2016 (in Russian).
3. Agriculture development and regulation of agricultural production, raw materials and food markets program for 2013–2020. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. URL: <http://ivo.garant.ru/#/document/70210644/paragraph/1188610:0> (in Russian).
4. Decree of the President of the RF No. 120 dated January 30, 2010 “On adoption of the Doctrine of food security of the Russian Federation”. URL: <http://legalacts.ru/doc/ukaz-prezidenta-rf-ot-30012010-n-120/> (in Russian).
5. Instruction on the use of reagents “AmpliPrime DNA-sorb-B kit” for DNA extraction from clinical material. M.: ООО “NextBio”, 2012 (in Russian).
6. Instruction on the use of “ASF” test system for African swine fever virus detection using polymerase chain reaction. M.: FBUN TsNII for Epidemiology of the Rospotrebnadzor, 2017 (in Russian).
7. Terrestrial Animal Health Code. Vol. 2. Recommendations applicable to OIE Listed diseases of importance to international trade. OIE. 25th ed. Paris, France: OIE, 2016. Chap. 15.1: 751–756.
8. The forecast of African swine fever spread in Russia until 2025. A. K. Karaulov, A. A. Shevtsov, O. N. Petrova [et al.]. *Veterinariya i kormleniye*. 2018; 3: 12–14 (in Russian).
9. The forecast of African swine fever in Russia for 2016. O. N. Petrova, F. I. Korennoi, N. S. Bardina [et al.]. Vladimir: FGBU “ARRIAH”, 2016 (in Russian).
10. ASF prevention. Territorial administration of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor) for Novosibirsk Oblast. URL: <http://rshn-nso.ru/proflaktika-achs> (in Russian).
11. ASF current epidemic situation. Chronology. Rosselkhoz nadzor. URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/asf/chronology/> (in Russian).
12. World Organisation for Animal Health (OIE). URL: <http://www.oie.int>.

Поступила 25.07.18

Принята в печать 02.08.18