

с характерными изменениями сердечной мышцы («тигроидностью»). Затем в соседнем хозяйстве отмечали заболевание ящуром среди мясного скота, выращиваемого на открытом выгуле.

В Алжире в марте–апреле 2015 г. вследствие нелегального завоза животных возникло 12 очагов ящура типа О, в которых болели овцы и КРС. Широкое распространение ящур типа САТ-2 среди КРС разного возраста (вначале был типирован как САТ-1) получил в другом африканском государстве — Зимбабве вследствие контактов с дикими животными — резервуаром возбудителя болезни, несанкционированных перемещений животных из неблагополучных районов, завоза с рынков, при использовании общих пастбищ и водоемов. В январе–сентябре 2015 г. на территории этой страны было зарегистрировано 126 очагов, в которых из 164 726 животных заболело 5977 голов (3,6%). Невысокий процент заболевших ящуром животных в этой стране следует объяснить осуществлением профилактической вакцинации животных. Однако из-за недостаточного количества вакцины иммунизация животных не является поголовной, обеспеченность вакциной официально составляет 78%.

В Намибии в мае–июле 2015 г. было установлено 29 очагов заболевания ящуром среди КРС, при этом вначале возбудитель был определен как вирус типа САТ-2, а затем как САТ-1. По официальным данным, из 25 393 голов КРС, находившихся в очагах, заболело всего 364 животных (1,4%). Невысокая заболеваемость связана, вероятно, с осуществлением в стране профилактической вакцинации животных против ящура.

В большинстве зарубежных стран перечень осуществляемых противоящурных мероприятий включает полный или частичный санитарный убой животных, карантин, ограничения на перемещения животных и животноводческой продукции, скрининг, зонирование, дезинфекцию инфицированных помещений и инвентаря. В связи с возникновением ящура во многих государствах проводят вынужденную вакцинацию животных, даже несмотря на то, что до возникновения ящура действовал запрет на нее, как, например, в ЮАР. В официальных сообщениях в МЭБ руководители ветеринарных служб различных стран иногда указывают на применение симптоматического лечения больных животных, а чаще подчеркивают, что обходились без лечения зараженных животных. Во многих государствах в настоящее время большое внимание уделяется разработке и реализации планов поэтапной борьбы с ящуром с целью улучшения или сохранения официального статуса страны в соответствии с Глобальной стратегией борьбы с ящуром МЭБ/ФАО [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпизоотическая ситуация по ящурю в мире в 2013–2015 гг. характеризовалась определенной напряженностью. Возникновение ящура в 2013–2014 гг. в субъектах Российской Федерации, граничащих с неблагополучными странами, генетическое родство выделенных изолятов со штаммами, в них циркулирующими, дает основание предполагать занос из этих стран экзотических вирусов. Своевременная диагностика вспышек ящура, изучение выделенных изолятов, срочное изготовление вакцин с использованием новых штаммов и их оперативное применение в неблагополучных зонах позволило купировать и ликвидировать ящурные очаги. С целью недопуще-

ния заноса, возникновения и распространения ящура в России необходимо добиваться своевременного и полного осуществления общих и специальных ветеринарно-санитарных мер по обеспечению благополучия страны по ящурю, в том числе своевременного и поголовного охвата животных профилактической вакцинацией в соответствии с рекомендуемыми схемами и применением вакцин, приготовленных с использованием актуальных штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуленкин В.М. Ящур в Азиатско-Тихоокеанском регионе и его экономические последствия // Ветеринария. — 2014. — № 9. — С. 4–8.
2. Инфекционная патология животных. Руководство в 7 т. Т. 1. Ящур / ред. А.Я. Самуйленко. — М.: ВНИТИБП, 2014. — 264 с.
3. Комплекс совместных мер государств — участников СНГ по профилактике и борьбе с ящуром на период до 2020 г.: утв. решением Совета глав правительств СНГ 30.05.2014 г. — Минск, 2014. — 19 с.
4. Кременчугская С.Р., Луговская Н.Н., Фомина С.Н. Оценка эффективности противоящурной вакцинации животных в буферной зоне Российской Федерации в 2014 году // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир. — 2015. — Т. 13. — С. 20–28.
5. Критерии включения болезней, инфекций и инфестаций в список МЭБ // Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1. Общие положения / МЭБ. — 24-е изд. — Paris, France, 2015. — С. 4–7.
6. Мищенко А.В., Кременчугская С.Р., Рахманов А.М. Обострение эпизоотической ситуации по ящурю животных в Азии и России // Инновационные процессы в АПК: сб. статей 6-й Международной научно-практ. конф. преподавателей, молодых ученых, аспирантов и студентов РУДН. — М., 2014. — С. 168–171.
7. Рахманов А.М., Мищенко А.В., Фомина С.Н. Эпизоотическая ситуация по ящурю животных на Северном Кавказе // Вестник ветеринарии. — 2014. — Т. 69, № 2. — С. 11–14.
8. Шеин С.А. Вопросы угрозы распространения болезней животных и птиц на территории Российской Федерации // Farm Animals. — 2013. — № 3–4. — С. 28–36.
9. Щербakov А.В. Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура) // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3 (14). — С. 30–36.
10. Экономические последствия от ящура в Приморском крае в 2014 году / В.М. Гуленкин, А.К. Караулов, А.В. Мищенко [и др.] // Ветеринарный врач. — 2015. — № 4. — С. 9–12.
11. Эпизоотологические особенности ящура типа А, вызванные гетерологичными штаммами вируса / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, В.В. Дрыгин [и др.] // Ветеринария. — 2014. — № 11. — С. 20–24.
12. Ящур / А.Н. Бурдов, А.И. Дудников, П.В. Малярец [и др.]; под ред. А.Н. Бурдова. — М.: Агропромиздат, 1990. — 320 с.
13. OIE. Disease Information. — 2013. — Vol. 26. — № 1–52.
14. OIE. Disease Information. — 2014. — Vol. 27. — № 1–52.
15. OIE. Disease Information. — 2015. — Vol. 28. — № 1–53.
16. The Global Foot and Mouth Disease Control Strategy / OIE/FAO. — Paris, 2012. — 44 p.

УДК 619:61698:578:616-078

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БОЛЕЗНИ ШМАЛЛЕНБЕРГ В РЕАКЦИИ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ

С.В. Кононова¹, О.П. Бьядовская², А.А. Нестеров³, И.Н. Шумилова⁴, А.В. Кононов⁵

¹ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononova@arriah.ru

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

³ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nesterov@arriah.ru

⁴ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁵ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по использованию реакции микронейтрализации для выявления специфических антител к вирусу болезни Шмалленберг. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью и пригоден для анализа сывороток крови различных видов животных.

Ключевые слова: вирус болезни Шмалленберг, культура клеток, инфекционная активность, реакция микронейтрализации.

UDC 619:61698:578:616-078

DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO SCHMALLEMBERG VIRUS USING MICRONEUTRALISATION TEST

S.V. Kononova¹, O.P. Byadovskaya², A.A. Nesterov³, I.N. Shumilova⁴, A.V. Kononov⁵

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH» Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nesterov@arriah.ru

⁴ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁵ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

SUMMARY

The article presents data on microneutralization test for detection of specific antibodies to Schmallenberg virus. The method is characterized by high sensitivity and specificity. It can be used for analysis of blood sera of different species of animals.

Key words: Schmallenberg virus, cell culture, infectivity, microneutralization test.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевание жвачных животных, вызванное вирусом болезни Шмалленберг (БШ), было впервые зарегистрировано в странах Европы летом 2011 г. Новый вирус относится к семейству *Bunyaviridae* и имеет высокую степень гомологии с геномами вирусов, входящих в серогруппу *Simbu*, являющихся представителями рода *Orthobunyavirus* [2].

Установлена патогенность вируса БШ для овец, коз и крупного рогатого скота (КРС). Вирус был выявлен также у диких и находящихся в неволе альпак, зубров (бизонов), косулей, благородных оленей, ланей, муфлон и даже собак [4].

Основными путями распространения вируса БШ являются: трансмиссивный, трансплацентарный и через сперму инфицированных животных [7]. Потенциальными переносчиками являются мокрецы рода *Culicoides* [5].

По данным МЭБ, клинические признаки БШ регистрировались в 9 странах: Бельгии, Великобритании, Германии, Испании, Италии, Люксембурге, Нидерландах, Франции, Швейцарии [8].

При проведении мониторинговых исследований проб сывороток крови на наличие антител к вирусу БШ были выявлены серопозитивные животные в ряде регионов Российской Федерации (РФ), в частности в Республике Татарстан, Красноярском крае, Белгородской, Брянской, Владимирской, Калининградской, Нижегородской, Костромской, Псковской, Курской, Московской, Тверской, Тульской и Ярославской областях.

В настоящий момент меры борьбы с БШ сводятся к мониторингу среди восприимчивых животных, изменению условий их содержания и карантину заболевших животных. В период активности насекомых-переносчиков необходимо обеспечить защиту животных от их укусов.

Таблица 1
Результаты исследования сывороток крови животных методами ИФА и РМН

Характеристика сыворотки	Наличие антител к вирусу БШ				
	Н-ИФА (IDVET)*		РМН**		
	% позитивности	результат	титр	результат	
Сыворотка, содержащая антитела к вирусу БШ	КРС	195	пол.	1:16	пол.
		173	пол.	1:16	пол.
		119	пол.	1:8	пол.
		250	пол.	1:16	пол.
		185	пол.	1:16	пол.
		128	пол.	1:8	пол.
		138	пол.	1:8	пол.
		141	пол.	1:8	пол.
		169	пол.	1:8	пол.
		154	пол.	1:8	пол.
	МРС	114	пол.	1:8	пол.
		188	пол.	1:16	пол.
		158	пол.	1:8	пол.
		162	пол.	1:8	пол.
		149	пол.	1:8	пол.
		95	пол.	1:4	пол.
		80	пол.	1:4	пол.
	европейский муфлон	117	пол.	1:8	пол.
		193	пол.	1:16	пол.
		201	пол.	1:32	пол.
европейская лань	213	пол.	1:32	пол.	
	221	пол.	1:64	пол.	
благородный олень	151	пол.	1:8	пол.	
	160	пол.	1:8	пол.	
Нормальная сыворотка	КРС	85	пол.	1:4	пол.
		139	пол.	1:8	пол.
	0	отр.	1:2	отр.	
	0	отр.	<1:2	отр.	
	0	отр.	<1:2	отр.	
Референтная отр. сыворотка (IDVET)	МРС	0	отр.	<1:2	отр.
		0	отр.	<1:2	отр.
Референтная пол. сыворотка (IDVET)		100	пол.	1:128	пол.
Сыворотка, специфичная к вирусу:	ВД КРС	0	отр.	<1:2	отр.
	ИРТ КРС	0	отр.	<1:2	отр.
	ПГ-3 КРС	0	отр.	<1:2	отр.

* результат в Н-ИФА (IDVET) в разведении 1:10 по % (s/p) ≤50% — отрицательный, >60% — положительный;
** титр в РМН ≤2 — отрицательный, ≥4 — положительный результат; пол. — положительный; отр. — отрицательный.

Диагностика заболевания осуществляется серологическими методами (разработаны коммерческие наборы иммуноферментного анализа (ИФА)) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Учеными института им. Ф. Лёффлера (Германия) разработана и валидирована ПЦР-тест-система для выявления вируса в образцах крови и патологическом материале, используемая в научно-исследовательских институтах стран Европейского союза. Однако для выявления специфических антител к вирусу БШ рекомендуемым методом является реакция нейтрализации [8].

Цель настоящей работы состояла в изучении возможности использования реакции микронейтрали-

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

ции (РМН) для выявления вируснейтрализующих антител к вирусу БШ в сыворотках крови различных видов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В опытах использовали вирус БШ (изолят ВН80/11-4, регистрационный номер RVB-1099, полученный из института им. Ф. Лёффлера, Германия). Вирусный материал был адаптирован к культурам клеток (КК) ВНК-21/13 (перевиваемая линия КК почки сирийского хомяка, Beby hamster kidney cell), Vero (перевиваемая линия КК почки африканской зеленой мартышки, *Cercopithecus aethiops*), ПС (перевиваемая линия КК почки сайги, *Saiga tatarica* L.). Активность вируса в данных КК составляла 4,0–4,5 ТЦД₅₀/см³ [1].

Вирус БШ титровали микрометодом в стерильных 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах общепринятым методом. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³.

На основании результатов предварительного титрования готовили рабочие разведения вируса БШ в пределах 200 ТЦД₅₀/0,05 см³.

Сыворотки. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали референтные сыворотки крови (IDVET, Франция). Материалом для исследования служили сыворотки крови жвачных животных, полученные из различных хозяйств РФ, неблагополучных по данной патологии. Контрольные и исследуемые сыворотки инактивировали 30 мин на водяной бане при 56°C и в необходимом объеме использовали для постановки РМН.

Постановку РМН проводили согласно «Методическим рекомендациям по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в реакции нейтрализации микрометодом» [6]. Для этого готовили 2-кратные разведения исследуемых сывороток в объеме 0,05 см³ на питательной среде Игла. Далее во все лунки планшета вносили по 0,05 см³ рабочего разведения вируса (200 ТЦД₅₀/0,05 см³). Планшеты инкубировали в СО₂-инкубаторе при температуре 37°C в течение 1 ч. После чего во все лунки планшета вносили суспензию КК Vero или ВНК-21/13 с концентрацией клеток 0,4–0,6×10⁶ кл/см³ и помещали в СО₂-инкубатор при температуре 37°C на 48–96 ч. Наблюдения проводили с использованием инвертируемого микроскопа, регистрируя лунки с выраженным ЦПД вируса и/или с цельным неповрежденным монослоем.

При исследовании полевых сывороток отрицательными считали пробы в разведении 1:2, положительными — начиная с разведения 1:4 и выше.

С целью оценки специфичности и чувствительности разработанного метода проводили сравнение результатов РМН с результатами ИФА коммерческого набора для выявления антител к вирусу БШ в сыворотках крови жвачных животных (ID Screen Schmallenberg virus Competition Multi-species фирмы IDVET, Франция). Относительную чувствительность и специфичность метода РМН вычисляли по стандартной формуле [3]. Полученные результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы Statistica 6,0: Basic Statistics and Tables.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью РМН было проведено исследование 536 проб сывороток крови животных, полученных из различных субъектов РФ (Калининградской, Псковской, Владимирской, Нижегородской областей,

БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

Республики Татарстан). Результаты частично представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что разработанный способ постановки РМН позволяет выявлять антитела к вирусу БШ в сыворотках крови различных видов жвачных животных, при этом результаты, полученные с помощью РМН, сопоставимы с результатами коммерческого теста ИФА.

Для подтверждения специфичности РМН были использованы гетерологичные сыворотки крови КРС, имеющие антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС, вирусной диареи (ВД) КРС, парагриппа-3 (ПГ-3) КРС, полученные после иммунизации животных вакцинами эмульсионными инактивированными производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (табл. 1). Было показано, что реакция с гетерологичными сыворотками не превышала фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

Для определения относительной чувствительности и специфичности метода проводили сравнение результатов РМН с результатами коммерческого набора ИФА. Результаты исследования сывороток крови животных с помощью двух тест-систем представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, с помощью двух тест-систем исследовали 132 пробы сывороток крови от КРС и МРС. Специфичность РМН относительно ИФА составила 88,6%, а относительная чувствительность — 85,2%.

Кроме того, проведенное исследование 132 проб сывороток с различным уровнем антител к вирусу БШ использовали для установления корреляционной зависимости между РМН и ИФА. Результаты частично представлены в табл. 3 и на рисунке.

Результаты двух тестов подвергали регрессионному анализу. Коэффициент корреляции (r) между результатами РМН и ИФА при 95% вероятности составил 0,889.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ свидетельствовал о том, что разработанная РМН может применяться как альтернативная методу ИФА для выявления антител против изучаемой инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было показано, что разработанная реакция микронейтрализации позволяет выявлять вирусспецифические антитела против вируса болезни Шмалленберг в сыворотках крови различных видов жвачных животных.

Метод продемонстрировал высокую специфичность (88,6%), чувствительность (85,2%) и корреляцию относительно ИФА (r=0,889) и может быть использован в рамках проведения мониторинговых исследований по оценке степени распространения данной инфекции у восприимчивых животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаптация вируса болезни Шмалленберг к перевиваемым клеточным культурам / С.В. Кононова, А.А. Нестеров, В.В. Думова [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 2 (13). — С. 17–21.
2. Болезнь Шмалленберга: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина / А.В. Спрыгин, А.В. Кононов, Ю.Ю. Бабин, В.А. Мищенко // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 6. — С. 24–34.
3. Дудников С.А. Количественная эпизоотология: основы прикладной эпидемиологии и биостатистики. — Владимир: Демиург, 2004. — 460 с.
4. Князев В.П. Болезнь Шмалленберг. — Владимир, 2015. — 55 с.

Таблица 2
Оценка относительной чувствительности и относительной специфичности РМН

ИФА	РМН		
	Положительные сыворотки	Отрицательные сыворотки	Всего
Положительные сыворотки	75	13	88
Отрицательные сыворотки	5	39	44
Всего	80	52	132

Таблица 3
Данные для построения графика линейной зависимости Lg T (РМН) от Lg S/P (ИФА)

№ п/п	РМН		ИФА	
	Титр	Lg T	S/P	Lg S/P
1	1:4	0,60205991	0,90	-0,045757491
2	1:4	0,60205991	0,74	-0,15490196
3	1:4	0,60205991	0,76	-0,119186408
4	1:4	0,60205991	0,79	-0,102372909
5	1:4	0,60205991	0,84	-0,075720714
6	1:8	0,903089987	1,28	0,10720997
7	1:8	0,903089987	1,38	0,139879086
8	1:8	0,903089987	1,67	0,222716471
9	1:8	0,903089987	1,41	0,149219113
10	1:8	0,903089987	1,69	0,227886705
11	1:16	1,204119983	2,13	0,328379603
12	1:16	1,204119983	2,47	0,392696953
13	1:16	1,204119983	1,84	0,264817823
14	1:16	1,204119983	1,91	0,281033367
15	1:16	1,204119983	1,20	0,294466226

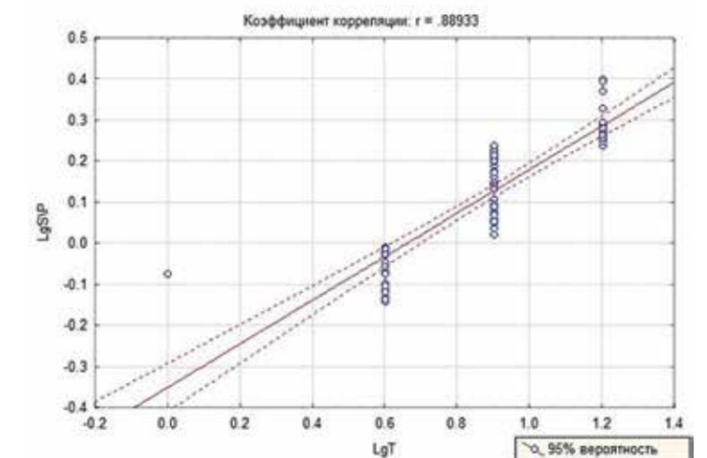


Рис. График линейной зависимости Lg T (РМН) от Lg S/P (ИФА)

5. Кухаркина О.В., Борисова О.А. Болезнь Шмалленберга: обзор литературы. — Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2014. — 70 с.
6. Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в реакции нейтрализации микрометодом / С.В. Кононова, В.В. Думова, А.А. Нестеров [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 24 с.
7. Gibbens N. Schmallenberg virus: a novel viral disease in northern Europe // Vet. Rec. — 2012. — Vol. 170, № 2. — P. 58.
8. Schmallenberg virus // OIE. Technical Factsheet. — 2012. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf.