

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/369626188>

# БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 2021

Book · March 2023

DOI: 10.31016/viev-2021-66

---

CITATIONS  
0

READS  
1,326

25 authors, including:



Alexander G Glotov

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academ...

121 PUBLICATIONS 279 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Tatyana Glotova

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies

110 PUBLICATIONS 260 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Anton Yuzhakov

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center VIEV"

72 PUBLICATIONS 331 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Tatiana Vladimirovna Grebennikova

Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology

140 PUBLICATIONS 973 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

АКТУАЛЬНЫЕ  
ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА



# АКТУАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Руководство*

Под редакцией доктора биологических наук, профессора  
**Т.И. Алипера**

*Допущено федеральным учебно-методическим объединением в системе высшего образования по укрупнённой группе специальностей и направлений подготовки 36.00.00 «Ветеринария и зоотехния» в качестве руководства для межвузовского использования в учебных организациях, реализующих программы высшего образования по специальности 36.05.01 «Ветеринария»*

Москва  
2021

УДК 619:616.9:636.2  
ББК 48.731.311

**Актуальные инфекционные болезни крупного рогатого скота:** Руководство / Под ред. проф. Т.И. Алипера. — М.: ЗооВетКнига, 2021. — ...с.

ISBN 978-5-6045813-8-4  
DOI:10.31016/viev-2021-6

Руководство посвящено вопросам инфекционной патологии крупного рогатого скота (КРС) и содержит не только классические статьи и обзорные материалы, описывающие наиболее опасные, широко распространенные и экономически значимые инфекционные болезни КРС, а также средства борьбы с ними и методы диагностики. Все приведенные данные основаны на анализе последних достижений мировой науки и практики и на результатах собственных исследований авторов.

Ряд статей являются научно-теоретическими и описывают глубокие молекулярно-биологические и физиологические процессы организма крупного рогатого скота, такие как: иммунитет в целом и различные виды иммунного ответа на вакцинацию, а также явления, происходящие при взаимодействии нескольких инфекционных агентов в развитии патологических процессов у крупного рогатого скота.

Издание адресовано ветеринарным врачам, желающим получить новейшую информацию по проблемам борьбы с инфекционными болезнями крупного рогатого скота, может быть использовано как информационно-справочное пособие для практикующих ветеринарных врачей животноводческих предприятий, а также научно-методическое пособие для студентов, аспирантов и научных сотрудников в области иммунологии и инфекционной патологии крупного рогатого скота.

Рецензенты:  
**Груздев К.Н.**, д-р биол. наук, профессор, заслуженный ветеринарный врач РФ;  
**Урываев Л.В.**, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН.

ISBN 978-5-6045813-8-4  
DOI:10.31016/viev-2021-6

## **СОДЕРЖАНИЕ**

ПРЕЗЕНТАЦИЯ АВТОРОВ РУКОВОДСТВА .....	8
<b>I. ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИВОТНОВОДСТВА (Алипер Т.И.) .....</b>	<b>4</b>
1. Концепция «Единого здоровья» .....	4
2. История одомашнивания крупного рогатого скота.....	4
3. Современное состояние отрасли молочного и мясного животноводства .....	4
4. Прикладная иммунология на службе охраны здоровья.....	4
5. Вакцинация — ключ к здоровью человечества .....	4
6. Предпосылки к написанию настоящей монографии .....	4
<b>II. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗДОРОВЬЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД (Власова А.Н., Сайф Л.) .....</b>	<b>4</b>
<b>III. ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ. ВАКЦИНЫ И ВАКЦИНАЦИЯ (Верховский О.А., Шемельков Е.В.) .....</b>	<b>4</b>
<b>IV. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НА ЗАЩИТЕ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ (Забережный А.Д., Алипер Т.И.) .....</b>	<b>4</b>
<b>V. БАКТЕРИИ И АНТИБИОТИКИ: МНОГОВЕКОВАЯ ИСТОРИЯ БОРЬБЫ (Севастьянова Т.В., Панин А.Н.).....</b>	<b>4</b>
<b>VI. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.....</b>	<b>4</b>
Иммунологические методы диагностики (Верховский О.А.) .....	4
Молекулярные методы анализа (Гребенникова Т.В.) .....	4

Методы определения последовательности нуклеиновых кислот (секвенирования) и их применение для диагностики и изучения возбудителей болезней животных (Южаков А.Г.).....	4
<b>VII. ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА .....</b>	<b>4</b>
Чума крупного рогатого скота (Орлянкин Б.Г., Верховский О.А., Мищенко В.А.) .....	4
Ящур (Мищенко А.В., Мищенко В.А., Орлянкин Б.Г., Шевкопляс В.Н.).....	4
Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (Гулюкин М.И., Степанова Т.В.)	4
Инфекционный ринотрахеит / инфекционный пустулезный вульвовагинит крупного рогатого скота (Верховская А.Е., Верховский О.А., Непоклонова И.В., Глотов А.Г., Алипер Т.И.) .....	4
Вирусная диарея — болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (Bovine viral diarrhoea — mucosal disease, BVDV) (Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Иванов Е.В.) .....	4
Коронавирусы КРС и вызываемые ими заболевания (Власова А.Н., Сайф Л.).....	4
Ротавирусная инфекция крупного рогатого скота (Алексеев К.П., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И.) .....	4
Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота (Шемелькова Г.О., Забережный А.Д.) .....	4
Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота (Bovine respiratory syncytial infection, BRSV) (Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г.).....	4
Парагрипп-3 крупного рогатого скота (Верховская А.Е., Верховский О.А., Кис В.И., Алипер Т.И.).....	4
Блютанг (Власова Н.Н.).....	4
Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (Власова Н.Н.) .....	4
Болезнь Шмалленберг (Орлянкин Б.Г., Шевкопляс В.Н.) .....	4
Бешенство (Гулюкин А.М.).....	4
Злокачественная катаральная горячка крупного рогатого скота (Мищенко В.А., Мищенко А.В.).....	4
<b>VIII. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА .....</b>	<b>4</b>
Сибирская язва (Шабейкин А.А.) .....	4
Бруцеллез (Скляров О.Д., Климанов А.И., Бабичева О.В.) .....	4
Туберкулез крупного рогатого скота (Найманов А.Х., Букова Н.К.) .....	4
Паратуберкулез крупного рогатого скота (Найманов А.Х., Букова Н.К.) .....	4
Сальмонеллез крупного рогатого скота (Капустин А.В., Лайшевцев А.И.) .....	4
Пастереллез крупного рогатого скота (Лайшевцев А.И., Капустин А.В.) .....	4

Манхеймиоз крупного рогатого скота (Лаишевцев А.И.) .....	4
Эшерихиоз (coliбактериоз) телят (Капустин А.В., Лаишевцев А.И.) .....	4
Лептоспироз крупного рогатого скота (Соболева Г.Л., Концевая Н.Н.) .....	4
Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызванный Moraxella bovis (Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Иванов Е.В.) .....	4
Эмфизематозный карбункул (Капустин А.В.) .....	4
Злокачественный отек (Капустин А.В., Моторыгин А.В.).....	4
Анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота (Капустин А.В.) .....	4
Некробактериоз крупного рогатого скота (Капустин А.В., Иванов Е.В.) .....	4
Инфекционные маститы у коров (Капустин А.В., Иванов Е.В.).....	4
<b>IX. МИКОТИЧЕСКИЕ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (Маноян М.Г., Панин А.Н.).....</b>	<b>4</b>
<b>IX. ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ (Кальнов С.Л., Верховский О.А., Гребенникова Т.В., Кривонос А.В., Алипер Т.И.).....</b>	<b>4</b>
<b>XI. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРИ ПРОИЗ- ВОДСТВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (Шемельков Е.В., Соболева Г.Л., Кривонос А.В.) .....</b>	<b>4</b>
<b>XII. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРОВ РУКОВОДСТВА ПО ВОПРОСАМ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА за 1990–2020 гг.....</b>	<b>4</b>

# ПРЕЗЕНТАЦИЯ АВТОРОВ РУКОВОДСТВА



**Алипер Тарас Иванович**

Доктор биологических наук, профессор, генеральный директор НПО «НАРВАК», директор по науке и инновациям «Ветбиохим», заведующий лабораторией прикладной вирусологии и биотехнологии ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ.

Активно используя в научной и производственной деятельности современные мировые научные достижения в области биотехнологии, иммунологии, генной инженерии, молекулярной биологии и др., руководимому им коллективу удалось создать новое поколение биопрепаратов, внедрить целый арсенал новых технологических решений при производстве лекарственных средств для животных.

По результатам многолетних научно-исследовательских работ Т.И. Алипером опубликовано более 350 печатных работ, в т.ч. около 60 — в изданиях международных форумов и зарубежных специализированных научных журналах, подготовлено совместно с коллективом сотрудников более 80 нормативных документов и технологических инструкций, регламентирующих производство и контроль ветеринарных

биопрепаратов, получено 22 патента и авторских свидетельств на изобретения.

Он является соавтором монографий «Вирусы и вирусные вакцины» (М., 2007), «Основы противовирусного иммунитета» (М., 2011), «Вирусы и вирусные инфекции» (М., 2013), «Основы противовирусного иммунитета» (2-е изд., М., 2015), «Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек» (М., 2017), «Актуальные инфекционные болезни свиней» (М., 2019), под его руководством защищены 9 кандидатских и 1 докторская диссертация.



**Линда Сайф (Linda Saif)**

Академик, заслуженный профессор Университета штата Огайо, руководитель исследовательских программ в области здоровья сельскохозяйственных животных и превентивной ветеринарной медицины Университета штата Огайо, действительный член пяти ведущих ветеринарных ассоциаций США в области ветеринарной медицины, вирусологии и болезней сельскохозяйственных животных, член Американского общества иммунологии, возглавляла ежегодный Конгресс ветеринарной медицины США.

Доктор Линда Сайф закончила Колледж ветеринарной медицины в Бустере, штат Огайо, США в 1969 г. по специальностям «Биология», «Биохимия».

Степень магистра получила в 1971 г., а степень PhD — в 1976 г. в Университете штата Огайо по специальностям «Иммунология», «Вирусология». С тех пор работает в Университете штата Огайо и в Сельскохозяйственном научно-исследовательском центре штата Огайо. В 2003 г. избрана действительным членом Национальной академии наук США.

Линда Сайф в конкурентной атмосфере получила 77 крупных грантов на финансирование исследований. Она автор 350 научных публикаций и многих изобретений.



**Панин Александр Николаевич**

Российский учёный в области ветеринарной микробиологии и эпизоотологии. Доктор ветеринарных наук (1992), профессор (1995), академик Российской академии наук (2013); академик РАСХН с 2001, член-корреспондент с 1995 г. Директор Всероссийского НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ФГБУ «ВГНКИ») (1990–2015). Почётный президент Национальной ветеринарной ассоциации.

Является экспертом ФАО ООН и ВОЗ по пищевым токсикоинфекциям. Являлся координатором по ветеринарным препаратам Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ).

Один из создателей множества вакцин против лептоспироза, стрептококкозов, микозов животных, 8 пробиотических препаратов. Опубликовал более 650 научных трудов, в том числе за рубежом, среди работ — 3 монографии. Имеет 50 авторских свидетельств и патентов на изобретения. Заслуженный деятель науки Российской Федерации (2000). Лауреат Государственной премии РФ в области науки и техники (1998), премий Правительства РФ в области науки и техники (1996, 2002, 2008, 2016). Награждён медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» I степени (2013), медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (1997), медалью «За заслуги» Международного эпизоотического бюро.



**Гулюкин Михаил Иванович**

Доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик Российской академии наук, лауреат Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

Является ведущим ученым в области ветеринарной лейкозологии, внесшим большой вклад в изучение этиологии и патогенеза, разработку средств и методов диагностики, системы оздоровления крупного рогатого скота от лейкоза.

Им опубликовано более 500 научных публикаций и научно-методических работ, большинство из которых посвящено вопросам лейкоза КРС.

Является членом секции ветеринарии НТС МСХ РФ, комиссии по борьбе с заразными болезнями животных на территории РФ МСХ РФ, комиссии МСХ РФ по организации и проведению оценки результативности деятельности научных организаций, подведомственных МСХ РФ; заместителем председателя методической комиссии секции зоотехнии и ветеринарии ОСХН РАН, председателем Государственной экзаменационной комиссии на факультете ветеринарной медицины МГАВМиБ им. К.И. Скрябина.

Избран иностранным членом Украинской академии аграрных наук, почетный профессор Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины, Харьковской государственной зооветеринарной академии, Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — Московской ветеринарной академии имени К.И. Скрябина, Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины.

Награжден золотой медалью «За вклад в развитие агропромышленного комплекса России» Минсельхоза России, золотой медалью имени С.Н. Вышеселского Президиума РАСХН. М.И. Гулюкин имеет множество ведомственных и правительственные наград, благодарностей и грамот.



**Орлянкин Борис Григорьевич**

Доктор ветеринарных наук, профессор. Заведующий лабораторией

вирусных и бактериальных болезней АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных».

Б.Г. Орлянкин известен как крупный ученый в области ветеринарной вирусологии. Он внес большой вклад в изучение трансмиссивного гастроэнтерита, парвовирусной и ротавирусной болезней свиней. Им впервые в нашей стране выделены парвовирус и ротавирус свиней, изучены их биологические и иммунологические характеристики. Совместно с соратниками разработаны и внедрены в ветеринарную практику страны методы диагностики и средства специфической профилактики этих болезней.

Значительные исследования проведены Б.Г. Орлянкиным по изучению новых заболеваний свиней вирусной этиологии — репродуктивно-респираторного синдрома и цирковирусных болезней свиней. В результате работы впервые в нашей стране разработаны и внедрены в практику производства рекомбинантная вакцина против цирковирусной (ЦВС-2) болезни свиней, вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней инактивированные.

Основные результаты научной деятельности Б.Г. Орлянкина опубликованы в 190 научных работах и 6 монографиях. Им получено более 10 авторских свидетельств на изобретения. Под его руководством подготовлено и защищено 8 кандидатских и одна докторская диссертации.

Он награжден серебряными медалями ВДНХ, почетным знаком «Изобретатель СССР», грамотами Министерства сельского хозяйства РФ и Россельхознадзора.



**Власова Анастасия Николаевна**

Ветврач-биохимик, профессор, доцент Государственного университета штата Огайо, Вустер, Огайо, США.

Анастасия Николаевна увлеклась научной работой, что называется, с малых лет, и это не удивительно, т.к. она продолжатель династии научных-инфекционистов нашей страны, родоначальником которой является Митин Никифор Иванович, один из основоположников отечественной школы ветеринарной вирусологии.

Успешно защитила диссертацию на присуждение ученой степени кандидата биологических наук в 2004 г.

В настоящее время можно без преувеличения сказать, что А.Н. Власова — ученый с мировым именем, результаты деятельности и публикации которой широко востребованы в научном сообществе.

Ее научные исследования молекулярно-генетической структуры, физико-химических характеристик и этиологической роли в различных инфекционных болезнях свиней коронавирусов, выполненные под руководством почетного профессора Линды Сайф в Университете штата Огайо, не просто уникальны, но, помимо прочего, имеют большое практическое значение для разработки принципов и стратегии борьбы с инфекциями животных, ими обусловленными.



**Соболева Галина Леонидовна**

Доктор биологических наук. Лауреат Государственной премии РФ в области науки и техники. Заместитель генерального директора по качеству ООО «Ветбioxим».

25 лет трудовой деятельности Г.Л. Соболевой прошли в стенах научно-контрольного института «ВГНКИ» ветпрепаратов, в лаборатории — центре референции для стран — членов СЭВ под руководством профессора Ю.А. Малахова и 20 лет — в компаниях НПО «НАРВАК» и ООО «Ветбioxим».

Проведенные фундаментальные работы по изучению лептоспир и лептоспироза позволили в соавторстве разработать универсальную технологию изготовления и методы контроля комплекса средств диагностики и специфической профилактики лептоспироза животных, в т.ч. для КРС: вакцины поливалентной «ВГНКИ» против лептоспироза животных; вакцины концентрированной против лептоспироза животных; вакцины против лептоспироза животных лиофилизированной; набора для диагностики лептоспироза животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и др.; совершенствовать меры борьбы с лептоспирозом животных, улучшить эпизоотическую и эпидемиологическую ситуацию по лептоспирозу в стране.

Г.Л. Соболева — соавтор-разработчик более 75 нормативных докумен-

тов, регламентирующих производство и контроль качества ветеринарных биопрепараторов. Ею опубликовано более 280 печатных работ, в т.ч. более 30 — в изданиях международных форумов и зарубежных специализированных научных журналах; она соавтор более 25 авторских свидетельств и патентов, 3 монографий.

Утверждены и по сей день используются на практике Стандарт СЭВ «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза» (ГОСТ 25386-91, 1991).

Награждена медалью «В память 850-летия Москвы», золотыми, серебряными медалями и дипломами ВДНХ (ВВЦ), благодарностью и Почетной грамотой Министерства сельского хозяйства РФ.



#### **Верховский Олег Анатольевич**

Доктор биологических наук (1999 г.), профессор по специальности «Биотехнология» (2006 г.).

Возглавляет автономную некоммерческую организацию «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных».

Под его руководством был внедрен в практику ряд вакцин против наиболее этиологически и экономически значимых болезней мелких домашних и сельскохозяйственных животных, новые диагностические тест-системы на основе ПЦР, ИФА, ИХМ. Успешно

выполнены многочисленные проекты НИР/НИОКР, включая проекты с ведущими ветеринарными центрами США и Европы.

Опубликовано более 170 печатных работ.

Является соавтором монографий «Иммунодефициты домашних животных» (М., 1996), «Основы иммунологии и иммунопатологии собак» (М., 2000), «Вирусы и вирусные инфекции» (М., 2013), «Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек» (М., 2017), «Актуальные инфекционные болезни свиней» (М., 2019).

О.А. Верховский является экспертом РАН (2016), членом диссертационного совета по присуждению научных степеней доктора и кандидата наук при ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, членом Научно-технического совета Россельхознадзора, почетным президентом Российского общества ветеринарной иммунологии и иммунопатологии (РОВИ).



#### **Капустин Андрей Владимирович**

Доктор ветеринарных наук, доцент, первый заместитель директора ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, заведующий бактериологическим отделом ООО «Ветбиохим».

Значительная часть трудовой деятельности А.В. Капустина прошла в стенах известного научного и координационного центра Российской Федерации, регламентирующего и

осуществляющего контроль обращения лекарственных средств ветеринарного назначения, в том числе процессы производства, контроль качества производимой продукции и фармаконадзор, — ФГБУ «ВГНКИ».

Учителем и наставником А.В. Капустина был авторитетнейший ветеринарный микробиолог нашей страны Юрий Алексеевич Малахов.

Эти два фактора определили высокий научный уровень и исключительную степень профессионализма и ответственности ученого-исследователя, контролера, технолога производства новых лекарственных средств для сельскохозяйственных животных А.В. Капустина.

В его послужном списке — более 100 печатных работы, 10 патента, более 20 выступлений с научными докладами на отечественных и международных форумах. Он автор-разработчик 15 нормативно-технических документов, нескольких поли- и моновалентных вакцин для профилактики бактерийных инфекций сельскохозяйственных животных.

За многолетний добросовестный труд в системе агропромышленного комплекса награжден благодарностью и Почетной грамотой Министерства сельского хозяйства РФ.



**Забережный Алексей Дмитриевич**

Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН,

директор ВНИТИБП, специалист в области вирусологии и молекулярной биологии. Внёс большой вклад в развитие геномных, клеточных и биоинженерных технологий, являющихся приоритетными критическими технологиями Российской Федерации, утвержденными Указом Президента РФ от 7 июля 2011 г. № 899 «Об утверждении приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и перечня критических технологий Российской Федерации».

Является одним из 6 членов экспертного совета Союза международных микробиологических обществ.

Забережный А.Д. является автором 20 изобретений, включая свидетельства о депонированных им авторских штаммах вирусов. За последние 5 лет под руководством и при участии Забережного А.Д. созданы 24 диагностические тест-системы на основе полимеразной цепной реакции для выявления вирусов животных. Результаты научно-исследовательской работы описаны более чем в 260 научных публикациях.

Его работы в области молекулярной эпизоотологии и разработки новых методов диагностики, а также их использования в полевых условиях признаны во всем мире, имеют высокий индекс цитирования (РИНЦ — 23) и высокий приоритет в России и мире, о чем свидетельствуют научные стипендии, премии и гранты, среди которых гранты РФФИ, МНТЦ, INTAS и др.

Забережный А.Д. является экспертом Российской академии наук (идентификационный номер эксперта РАН 2016-01-8909-0730).



### **Гребенникова Татьяна Владимировна**

Член-корреспондент Российской академии наук по Отделению медицинских наук РАН (специальность «Эпидемиология»), заведующая отделом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (г. Москва).

Гребенникова Т.В. — специалист в области эпидемиологии, молекулярной вирусологии, автор более 230 научных работ, 11 изобретений, соавтор в 8 монографиях.

Гребенниковой Т.В. и её учениками исследована первичная структура геномов отдельных представителей семейств вирусов *Arteriviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*. Установлены молекулярно-генетические особенности геномов и филогенетические связи для вирусов, циркулирующих на территории России, созданы функциональные инфекционные геномы РНК-содержащих вирусов с целью определения генетических детерминант вирулентности. На основе полученных данных разработано более 40 тест-систем ПЦР и ИФА, из которых 28 тест-систем внедрены в практику.

Под её руководством защищены 6 кандидатских диссертаций. Гребенникова Т.В. участвовала более чем в 30 международных конгрессах, включая конференции ВОЗ, МЭБ и ФАО.

Является ответственным секретарем редколлегии журнала «Вопросы вирусологии», членом двух диссертационных советов, Совета по науке и технике при Комитете Государственной Думы по науке и научно-техническим технологиям, заместителем председателя рабочей группы по мониторингу эффективности деятельности профессоров РАН.



### **Непоклонова Ирина Владимировна**

Кандидат ветеринарных наук. Заведующий отделом диагностики, терапии и профилактики болезней млекопитающих, птиц, пчел и рыб АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных».

И.В. Непоклонова — представитель первой и самой продуктивной отечественной школы ветеринарных вирусологов, возглавляемой пионером в области ветеринарной вирусологии академиком Сюриным Василием Николаевичем, первым заведующим первой кафедры вирусологии в ветеринарных вузах России.

Под руководством академика В.Н. Сюрина ею защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук.

Сфера ее научных интересов распространяется на изучение роли вирусов в развитии инфекционной патологии животных, разработку методов диагностики и средств специфической профилактики этих заболеваний. Она является

одним из авторов-разработчиков 8 вакцин и сывороток для профилактики и иммунотерапии инфекционных болезней кошек и собак, 6 диагностических наборов на основе ИФА и ИХТМ.

Опубликовано 52 научные работы, в том числе Непоклонова И.В. является соавтором «Справочника ветеринарного врача» (М.: КолосС, 2006), руководства по вирусологии «Вирусные инфекции человека и животных» под ред. академика РАН Д.К. Львова (2013), руководств «Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек» (М., 2017), «Актуальные инфекционные болезни свиней» (М., 2019).



### **Шемельков Евгений Владимирович**

Кандидат ветеринарных наук. Директор по производству ООО «Ветбиохим». Уполномоченное лицо по качеству. Е.В. Шемельков относится к разряду российских ученых и практиков, которых у нас в стране называют обычно «самородками».

Получив самое лучшее ветеринарное образование в России — в стенах Московской академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Е.В. Шемельков решительно вступил на научную стезю, в сжатый срок выполнив очень интересную и актуальную работу по усовершенствованию отечественных вакцин для сельскохозяйственных и домашних животных на основании использования новейших открытий по адьювантам.

Практическим результатом диссертационной работы Е.В. Шемелькова стало создание новых технологий производства инактивированных вакцин, которые были активно внедрены в биопромышленность.

Им опубликовано более 50 научных работ, которые неоднократно доложены на международных и отечественных форумах.

Е.В. Шемельков награжден благодарностью Министерства сельского хозяйства РФ (2016 г.).



### **Юзаков Антон Геннадьевич**

Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных».

Методы молекулярной биологии и генетической инженерии, использованные А.Г. Юзаковым при подготовке диссертационной работы и в дальнейших исследованиях, позволили идентифицировать и охарактеризовать большое количество изолятов вирусов, циркулирующих на территории РФ и вызывающих распространенные и экономически значимые болезни сельскохозяйственных животных, в том числе крупного рогатого скота.

При участии А.Г. Юзакова разработано 8 диагностических тест-систем на основе полимеразной цепной реакции,

а также оптимизирован подбор штаммов для современных рекомбинантных вакцин, в том числе для профилактики цирковирусных болезней и классической чумы свиней.

В настоящее время работает над изучением молекулярной структуры и молекулярной эпидемиологии возбудителей респираторного комплекса болезней свиней.

Опубликовано более 40 научных статей в российских и международных журналах, имеет 1 патент.



### **Гулюкин Алексей Михайлович**

Доктор ветеринарных наук по специальности «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология».

Специалист в области ветеринарной эпизоотологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, автор 208 научных работ. Направление научной деятельности: зооантропонозы, эпизоотология, бешенство животных, инфекционные и вирусные болезни животных, вопросы ветеринарной вирусологии, иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии.

Область научных интересов — изучение эпизоотического процесса распространения бешенства и других зооантропонозов в Российской Федерации; молекулярно-генетические характеристики полевых изолятов вируса бешенства; совершенствование методов

выявления возбудителя. Впервые исследователь проанализировал методологическую и научно-практическую базу оценки риска возникновения и распространения бешенства на территории Российской Федерации с применением геоинформационной системы (ГИС).

Директор ФГБНУ «ФНЦ — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», председатель Ученого совета Центра, член секции ветеринарии НТС Минсельхоза России, член комиссии Минсельхоза России по борьбе с заразными болезнями животных, член Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии государств — участников СНГ, член Межведомственного совета при Минобрнауки России по вопросам, связанным с реализацией КПНИ. Награжден почетными грамотами Министерства сельского хозяйства РФ, Почетной грамотой Россельхознадзора РФ, благодарностью губернатора Еврейской автономной области. Является почетным работником АПК, лауреатом ВВЦ (ВДНХ).



### **Власова Наталья Никифоровна**

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Н.Н. Власова с первых дней трудовой деятельности работала в области виру-

сологии, посвятив и кандидатскую, и докторскую диссертации фундаментальным и прикладным исследованием по проблемам этиологии, разработке методов диагностики и средств специфической профилактики особо опасных и экзотических вирусных болезней животных.

В настоящее время научные исследования Н.Н. Власовой направлены на изучение генома различных возбудителей инфекционных болезней животных, идентификации генов, связанных с вирулентностью, иммуногенностью и антигенной изменчивостью изучаемых возбудителей.

На протяжении 5 лет Власова Н.Н. участвовала в выполнении двух грантов РФФИ. Многие научные разработки Н.Н. Власовой защищены авторскими свидетельствами и патентами.

Н.Н. Власовой опубликовано более 190 научных работ, она соавтор 4 монографий. Более 40% результатов и итогов научных изысканий Н.Н. Власовой доложено на конгрессах и конференциях как в России, так и за рубежом.



**Глотов Александр Гаврилович**

Доктор ветеринарных наук, профессор.

Работает главным научным сотрудником, заведующим лабораторией биотехнологии — диагностический центр ФГБНУ Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН).

Научная деятельность посвящена ветеринарной вирусологии и эпизоотологии, разработке и усовершенствованию средств и методов диагностики вирусных и бактериальных болезней сельскохозяйственных животных на основе достижений биотехнологии и генной инженерии. Большая работа проводится по изучению молекулярной эпизоотологии герпес- и пестивирусов, а также бактерий семейства *Pasteurellaceae* в Сибири.

Под его руководством и при непосредственном участии разработаны 5 тест-систем на основе молекулярной гибридизации и полимеразной цепной реакции для выявления и дифференциации вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной дифтерии, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезов крупного рогатого скота.

Глотовым А.Г. опубликованы более 260 научных работ, получены 36 авторских свидетельства и патентов на изобретения РФ и Республики Казахстан, 24 методических рекомендации и пособия, 6 монографий. Подготовлены 2 доктора и 9 кандидатов наук.

Член экспертного совета ВАК по зоотехническим и ветеринарным наукам с 2014 года.

Александр Гаврилович является заслуженным ветераном Сибирского отделения РАН (2018), награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством 2 степени» (2011 г.), общественной медалью «За развитие биологической науки и промышленности» (2010 г.), медалью имени И.И. Синягина (2014 г.), юбилейной медалью «40 лет Россельхозакадемии» (2010 г.), почетными грамотами Президиума Россельхозакадемии (2005 г.), администрации Новосибирской области (2000, 2005 гг.) и другими.



### **Глотова Татьяна Ивановна**

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии — диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского ФГБУН Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН).

Глотова Т.И. является специалистом в области ветеринарной вирусологии и бактериологии. Работы посвящены изучению патогенеза и особенностей проявления вирусных и вирусно-бактериальных болезней крупного рогатого скота, разработке современных методов их диагностики на основе достижений молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция), а также определению их эффективности и диагностической ценности в производственных условиях.

Она внесла большой вклад в изучение особенностей течения, молекулярной эпизоотологии и патогенеза инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи — болезни слизистых оболочек, респираторно-синцитиальной инфекции, пастереллеза крупного рогатого скота в современных условиях ведения животноводства.

Глотова Т.И. является автором более 300 научных работ, 6 монографий, 37 изобретений, включая свидетельства о депонировании авторских штаммов

вирусов и бактерий, диагностических тест-систем на основе полимеразной цепной реакции для выявления вирусов и бактерий. Под ее руководством защищено восемь кандидатских и одна докторская диссертации.



### **Скляров Олег Дмитриевич**

Доктор ветеринарных наук (2006).

После окончания в 1990 году аспирантуры и по настоящее время работает в ФГУ/ФГБУ «ВГНКИ», с 2014 года по настоящее время — заведующий лабораторией качества и стандартизации бактериальных лекарственных средств.

Скляров О.Д. — высококвалифицированный специалист в области инфекционной патологии животных, им опубликовано в отечественных и зарубежных изданиях 135 научных работ, в том числе 9 патентов, а также 8 учебно-методических пособий. Под его руководством защищено 5 кандидатских и одна докторская диссертация.

Скляровым О.Д. совместно с сотрудниками ФГБУ «ВГНКИ» разработаны и внедрены в ветеринарную практику 9 вакцин, сывороток и диагностикумов, 8 стандартных образцов культур производственных штаммов для изготовления вакцин и диагностических тест-систем, 3 нормативно-технических документа, разработано 6 ГОСТов, регламентирующих проведение диагностики, профилактики и контроль зоонозных болезней.

По заданию Россельхознадзора и Департамента ветеринарии МСХ РФ ока-

зывал на местах научно-практическую и методическую помощь в профилактике и ликвидации зоонозных болезней в многочисленных регионах России, а также выезжал в зарубежные командировки с целью оценки риска по бруцеллезу, туберкулезу и другим зоонозным болезням животных при импорте продукции животноводства в РФ.



#### **Найманов Али Хусинович**

Доктор ветеринарных наук (1993), профессор (2006), заслуженный ветеринарный врач Российской Федерации (2004).

С 2001 года — заведующий лабораторией микобактериозов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

А.Х. Найманов является ведущим учёным Российской Федерации, внёсшим значительный вклад в совершенствование средств и методов диагностики, оздоровительных и профилактических мероприятий при туберкулёзе и паратуберкулёзе животных.

А.Х. Наймановым опубликовано более 310 научных работ, в т.ч. 7 монографий; он является автором 13 патентов, авторских свидетельств и 4 методических рекомендаций и пособий. Результаты его исследований включены в 8 нормативных документов, утвержденных директивными органами, в т.ч. в Санитарные и Ветеринарные правила «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. п.10 Туберкулэз» (1996 г.), в

«Наставление по диагностике туберкулёза животных» (1986, 2002 гг.), в «Наставление по диагностике паратуберкулёза животных» (2001 г.).

Под руководством А.Х. Найманова защищено 10 кандидатских диссертаций, он является научным консультантом 2 соискателей ученой степени доцента ветеринарных наук.

Неоднократно награждался почётными грамотами ВИЭВ, ВАСХНИЛ, РАСХН, МСХ РФ и Департамента ветеринарии МСХ РФ. Награждён медалями «В память 850-летия Москвы», «Ветеран труда», «За доблестный труд», «За заслуги в области ветеринарии», «За достижения в области ветеринарной науки», «Лауреат ВВЦ», «За вклад в развитие агропромышленного комплекса России».



#### **Букова Наталия Константиновна**

Доктор биологических наук (1999), профессор (2012), ученый секретарь ФГБУ «ВГНКИ».

Научная деятельность Н.К. Буковой посвящена вопросам бактериологии, биохимии, иммунологии, а также разработке и усовершенствованию средств и методов диагностики и профилактики хронических болезней животных (сапа, туберкулеза, паратуберкулеза, трипаносомоза).

Имеет более 115 печатных работ, в т.ч. монографию (2016), 7 авторских свидетельств и патентов РФ, является соавтором разработки более 50 нормативных документов, утвержденных

в установленном порядке, в частности «Инструкции по предупреждению и ликвидации сапа», «Наставления по диагностике сапа» (1996), «Наставления по диагностике паратуберкулеза (паратуберкулезного энтерита) животных» (2001) и «Наставления по диагностике туберкулеза животных» (2002).

Под ее руководством защищено 4 кандидатских и одна докторская диссертация по проблемам сапа, туберкулеза, трипаносомоза.

Является заместителем председателя объединенного диссертационного совета с участием ФГБУ «ВГНКИ», а также участвует в работе диссертационного совета и ГЭК ФГОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина».

За заслуги в области сельского хозяйства и многолетний добросовестный труд Букова Н.К. награждена медалью «850-летия Москвы», Почетной медалью РАЕН (2006), почетными грамотами Департамента ветеринарии (2001), Россельхозакадемии (2006), Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (2006 и 2011).



**Маноян Марина Георгиевна**

Кандидат ветеринарных наук, заведующая лабораторией микологической экспертизы и стандартизации лекарственных средств против микозов и микотоксикозов ФГБУ «ВГНКИ», член Национальной академии микологии,

программного и редакционного комитета, председатель и ведущий секции и симпозиумов Общероссийской национальной академии микологии «Ветеринарная микология», член Европейской конфедерации медицинских микологов (ЕСММ), член Международного сообщества по медицинской и ветеринарной микологии ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology) и рабочей группы по ветеринарной микологии (ISHAM-Veterinary Mycology Working Group).

Ученица и преемник научной школы заслуженного деятеля науки РСФСР, Героя Социалистического Труда, профессора, академика Саркисова Артема Христофоровича.

Автор более 80 научных работ по тематике в ведущих российских и международных журналах, обладатель 3 патентов на изобретение, автор 6 методических указаний, ГОСТов, глав в учебниках и учебных пособий.

Под руководством Маноян М.Г. выполнены 7 научных проектов, согласованных с Министерством образования и науки Российской Федерации, в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Маноян М.Г. неоднократно награждена Почетной грамотой Россельхознадзора.



**Севастьянова Татьяна Владимировна**

Научный сотрудник, старший научный сотрудник, ведущий научный

сотрудник, начальник отела ФГБУ «ВГНКИ» (1998–2011). Участвовала в научной разработке пробиотика-гепатопротектора, не имеющего аналога в России и за рубежом. Присвоена ученая степень кандидат ветеринарных наук (ветеринарная микробиология, иммунология, микология с микотоксикологией) (2009). Опубликовано более 10 научных статей, посвященных кишечной микробиоте различных видов животных и диагностике и профилактике дисбактериозов мелких домашних животных.

С 2011 г. — заместитель начальника отдела, начальник отдела Управления ветеринарного надзора при внешнеторговых операциях, на гос границе и транспорте Россельхознадзора (2011–2015); советник государственной гражданской службы Российской Федерации 2 класса (2014). С 2015 года — заместитель директора ФГБУ «ВГНКИ» (2015–2016). С 2016-го — заместитель директора, технический директор по качеству Испытательного центра ООО «Институт биотехнологии ветеринарной медицины» (2016–2019).

В настоящее время — заместитель исполнительного директора Ассоциации содействия развитию ветеринарного дела «Национальная ветеринарная ассоциация». Доцент кафедры фармакологии и общей патологии НГАУ с 2018 года.

Награждена грамотой Россельхознадзора (2009); благодарностью МСХ Российской Федерации (2013). Является действующим экспертом рабочей группы «Животноводство и растениеводство» Аналитического центра при Правительстве РФ в рамках «регуляторной гильотины».



**Кривонос Александр Вячеславович**  
Кандидат биологических наук, генеральный директор ООО «Ветбиохим».

Окончив Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Александр Вячеславович в течение многих лет работал во Всероссийском научном центре молекулярной диагностики и лечения (г. Москва), углубленно изучив теоретические и практические аспекты иммунологии человека при различных инфекционных заболеваниях. По итогам многолетних изысканий была успешно защищена диссертация на присуждение ученой степени кандидата биологических наук.

Эти глубокие знания вкупе с природным талантом исследователя и вдумчивого практика А.В. Кривонос успешно использовал при работе в НПО «НАРВАК» на должности заведующего производством. Его уникальные разносторонние знания позволили внести огромный вклад в формирование научно-обоснованной системы биотехнологических методов и послужить одним из основополагающих факторов в становлении и процветании предприятия.

Будучи в течение 15 лет генеральным директором «Ветбиохим», А.В. Кривонос помимо административных задач принял участие в разработке более десятка новых вакцинальных и фармпрепаратов, а также диагностических тест-систем для идентификации и дифференцирования инфекционных патогенов.



**Лашевцев Алексей Иванович**

Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, специалист бактериологического отдела ООО «Ветбиохим».

К основным научным интересам Лашевцева А.И. относится изучение редко встречаемых и/или ранее не описанных для территории РФ инфекционных патологий сельскохозяйственных животных и птицы бактериальной природы, в частности аризоноза индеек, рилемереллеза водоплавающей птицы, гистофиллёза крупного рогатого скота, контагиозного метрита лошадей, корине-, арканобактериозов животных и других, что, в свою очередь, отражено в научных работах российских и международных изданий, которых насчитывается более 50, в том числе он соавтор монографии «Современные аспекты борьбы с сальмонеллезной инфекцией в птицеводстве» (М., 2017).

Лашевцев А.И. является членом Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases — ESCMID). Награжден медалью Российской агропромышленной выставки «Золотая осень 2018» за разработку новых средств специфической профилактики.



**Мищенко Владимир Александрович**

Российский учёный в области ветеринарной вирусологии и эпизоотологии, доктор ветеринарных наук (1991), профессор (1994), заслуженный изобретатель Российской Федерации (1996), главный научный сотрудник Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Трудовую деятельность начал в 1971 году. В 1973 году поступил на работу во Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт (ВНИЯИ), где занимал должности старшего лаборанта и младшего научного сотрудника лаборатории диагностики ящура. Мищенко В.А. является создателем лабораторий индикации вирусов (ВНИЯИ) (1986) и болезней крупного рогатого скота (ФГБУ «ВНИИЗЖ») (1997). В 1992 году под его руководством впервые была диагностирована болезнь Ауески у одногорбых верблюдов, в 1993 году осуществлена индикация и идентификация вируса респираторно-репродуктивного синдрома свиней и были разработаны средства и методы диагностики данного заболевания.

Является разработчиком двадцати вакцин и химファрмпрепарата (вакцины против рота- и коронавирусной инфекции, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и другие), пятнадцати диагностических наборов, соавтором тридцати нормативных документов по диагно-

стике, специфической профилактике и борьбе с инфекционными болезнями животных.

Автор более 600 научных трудов, в том числе за рубежом, среди работ — монография «Болезнь Ауески». Имеет более 80 авторских свидетельств и патентов на изобретения. Под его руководством подготовлено и защищено 3 докторские и 23 кандидатские диссертации.



#### **Мищенко Алексей Владимирович**

Российский учёный в области ветеринарной вирусологии и эпизоотологии, доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник информационно-аналитического центра Управления ветнадзора Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

В 2003 году окончил Российской университет дружбы народов по специальности «Ветеринария». В том же году поступил в аспирантуру ФГБУ «ВНИИЗЖ». В 2007 году защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. Работал в ФГБУ «ВНИИЗЖ»: с 2007 по 2014 гг. в референтной лаборатории диагностики ящура в должности младшего научного сотрудника, научного сотрудника, старшего научного сотрудника и заведующего лабораторией; с 2014 по 2018 гг. — в должности заместителя директора по НИР и мониторингу ФГБУ «ВНИИЗЖ». В 2018 году работал в должности советника Министра сельского хозяйства Российской Федерации,

а затем — заместителя директора департамента ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. Являлся координатором научных международных программ по контролю ящура в Монголии и странах Закавказья.

Автор более 160 научных трудов, в том числе за рубежом. Имеет 16 авторских свидетельств и патентов на изобретения.



#### **Алексеев Константин Петрович**

Кандидат биологических наук (2004). Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных». В течение 3 лет К.П. Алексеев работал в лаборатории профессора Линды Сайф (Университет штата Огайо, США), исследуя иммунный ответ организма свиней на респираторные вирусные инфекции.

Иммунологические методы анализа в соединении с методами генной инженерии были использованы К.П. Алексеевым для разработки новых диагностических тест-систем и вакцинных препаратов. За годы работы К.П. Алексеев принял участие в разработке целого ряда диагностических тест-систем и вакцинных препаратов.

Его скромность прямо пропорциональна научно-практической результативности научных изысканий. Однако необходимо упомянуть, что К.П. Алексеев — соавтор-разработчик первой в Рос-

ции рекомбинантной вакцины против цирковирусных болезней свиней, активно применяемой в крупных свинокомплексах с высокой эффективностью.

Высоко оценены медицинской аудиторией научных работников результаты исследований К.П. Алексеева в области стратегии вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции человека.



**Кальнов Сергей Леонидович**

Кальнов С.Л. окончил биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова в 1975 г., работал в межфакультетской лаборатории биоорганической химии и молекулярной биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, во Всероссийском центре молекулярной диагностики и лечения, заместителем директора «ГУ ЦДП», в настоящее время — старший научный сотрудник ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ. Кандидат биологических наук.

Кальнов С.Л. обладает значительным профессиональным багажом: обширными и глубокими научно-теоретическими знаниями в области биохимии, молекулярной и клеточной биологии, опытом создания средств диагностики и профилактики опасных инфекционных болезней человека и животных, а также широким арсеналом научно-методических и технологических приемов.

Под его руководством защищены 3 кандидатские диссертации. На протяжении более 10 лет он являлся руководителем международных проектов

МНТЦ и Американского фонда гражданских исследований и разработок (АФГИР/CRDF). Разработка методов диагностики трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (прионных инфекций) человека и животных, отвечает наиболее значимой группе исследований, которым была посвящена основная деятельность Кальнова С.Л. в последние годы.

Кальновым С.Л. опубликовано более 50 печатных работ. Он автор ряда статей в 2 монографиях. Имеет правительственные награды.



**Шабейкин Александр Александрович**

Кандидат ветеринарных наук. Специалист в области эпизоотологии и эпидемиологии природно-очаговых болезней, мониторинга распространенности инфекционных заболеваний животных в условиях мегаполиса, математического моделирования эпизоотического процесса.

С 1999 года научная деятельность Шабейкина А.А. неотрывно связана с ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, где он в настоящее время возглавляет лабораторию эпизоотологии. Шабейкин А.А. входит в состав Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Ученого совета Приокско-Террасного заповедника, член секции ветеринария Научно-технического совета Минсельхоза России.

Шабейкин А.А. является автором 80 научных статей, разработчиком электронных кадастров неблагополучных

пунктов и случаев заболеваемости животных сибирской язвой и бешенством, входящих в состав тематических геоинформационных систем.

Имеет благодарности Министерства сельского хозяйства Российской Федерации и мэра Москвы.



#### **Концевая Наталия Николаевна**

Н.Н. Концевая окончила в 2003 г. Московскую ветеринарную академию им. К.И. Скрябина по специальности «ветеринарный врач».

Вся трудовая деятельность Наталии Николаевны, начавшаяся сразу после окончания вуза, посвящена практическим вопросам производства иммуно-биологических лекарственных препаратов, в том числе характеристикам их качества.

За почти два десятка лет работы на биологическом предприятии (вначале НПО «НАРВАК», затем «Ветбиохим») Н.Н. Концевая не только выросла как квалифицированный специалист, получив статус уполномоченного лица по качеству, но много внимания и времени уделяла научной работе по созданию нового поколения вакцин для крупного рогатого скота.

Итогом этих научных изысканий стала разработка двух новых комбинированных вакцин серии КОМБОВАК для профилактики широко распространенных и экономически значимых вирусных и бактериальных инфекций молодняка крупного рогатого скота,

которая не только позволила внедрить в практику животноводства актуальные препараты, но и успешно защитить диссертацию на присуждение ученой степени кандидата ветеринарных наук.

Творческий потенциал и способность к анализу как научных, так и практических аспектов, сопровождающих повседневную трудовую деятельность, позволяют Н.Н. Концевой активно публиковаться, выступать на научно-практических форумах, выполнять консультационно-методические функции, патентовать результаты работы.



#### **Верховская Анна Евгеньевна**

Кандидат ветеринарных наук, начальник отдела обеспечения качества ООО «Ветбиохим».

Верховская А. Е. в 2000 году с отличием окончила факультет ветеринарной медицины Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина. В этом же году начала свою трудовую деятельность в НПО «НАРВАК», где успешно совмещала производственную деятельность с научной работой.

Помимо теоретических и научно-практических знаний, полученных А.Е. Верховской, она непосредственно участвовала в разработке и внедрении в практику таких ныне широко известных на отечественном ветеринарном рынке вакцин против инфекционных болезней крупного рогатого скота, как Комбовак, Комбовак-Р, Комбовак-К.

Результаты этих разработок были обобщены в виде кандидатской диссертации, которая была успешно защищена в 2008 г.

Внедрение в практику российских биопредприятий в настоящее время принципов надлежащей производственной практики потребовали от А.Е. Верховской скрупулезного освоения новых квалификационных вершин, ею была разработана линейка нормативно-технических документов и технологических инструкций, регламентирующих производство и контроль ветеринарных биопрепараторов, получен патент РФ на изобретение.

Анна Евгеньевна является высококвалифицированным специалистом в области обеспечения качества лекарственных средств. Участвует в проводимых НИР/НИОКР, активно публикуется, является соавтором монографии «Вирусы и вирусные инфекции» (М., 2013).



**Иванов Евгений Валерьевич**

Иванов Е.В. получил высшее образование в Уральском государственном институте ветеринарной медицины (Троицкий ветеринарный институт) по специальности «Ветеринария», затем поступил в аспирантуру ВИЖа, успешно окончив ее и защитив в 2001 году диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Трудовая деятельность Иванова Е.В. изначально и до настоящего времени связана с практической работой по внедрению новых технологий

и средств борьбы с инфекционными болезнями крупного рогатого скота на животноводческих предприятиях России и сопредельных государств.

Он является уникальным специалистом, способным в самых сложных эпизоотологических ситуациях разобраться с причинами проблем и оказать эффективную помощь ветеринарным врачам на местах в исключении опасных и широко распространенных инфекций.

Его выступления на семинарах и курсах повышения квалификации ветеринарных врачей всегда вызывают интерес профессиональной аудитории, к его мнению прислушиваются руководители и ведущие специалисты региональных ветеринарных ведомств.

Совмещение трудовых обязанностей по продвижению вакцин для крупного рогатого скота, консультационной деятельности с должностью научного сотрудника в специализированном НИИ позволило Иванову Е.В. накопить обширный актуальный научно-практический материал, который представлен в данной монографии, а также будет использован для защиты докторской диссертации.



**Шемелькова Галина Олеговна**

Микробиолог отделения контроля качества ООО «Ветбиохим». Получила высшее образование по специальности «Биотехнология». Дальнейшим направлением для научно-исследова-

тельской работы выбрала направление по усовершенствованию существующих и разработке новых средств специфической диагностики и профилактики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

Одним из результатов выполняемой работы стала разработка и внедрение в производственную практику семикомпонентной вакцины КОМБОВАК-А против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, ротавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота, которая в настоящее время широко применяется на территории РФ и Республики Беларусь, а также «Тест-системы для выявления аденовируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции».

Основная практическая деятельность Шемельковой Г.О. связана с обеспечением и проведением контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов ветеринарного назначения, разработкой и внедрением нормативно-технической документации.



### **Шевкопляс Владимир Николаевич**

Доктор ветеринарных наук, профессор.

Научная эрудиция В.Н. Шевкопляса, необычайная работоспособность и организаторский потенциал способствовали его профессиональному

росту и продвижению по службе: плодотворной работе главным ветврачом хозяйства и района, профессором кафедры в Кубанском ГАУ и продолжению службы в качестве руководителя и главного государственного ветеринарного инспектора Краснодарского края, а затем и в центральном аппарате Россельхознадзора и Минсельхоза РФ, привнеся в эту сферу свежие идеи, прогрессивную методологию и перспективные проекты.

По итогам научно-педагогической работы В.Н. Шевкоплясом опубликовано более 160 научных и учебно-методических работ, из них 9 книг, в том числе атлас «Иксодофауна Краснодарского края» (2009); «Руководство по вирусологии» (2013); «Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания» (2018); «Руководство по акушерству, гинекологии и биотехнике размножения животных» (2004). Получено более 14 патентов РФ.

Работа В.Н. Шевкопляса по достоинству оценена присвоением почетного звания «Заслуженный ветеринарный врач Российской Федерации»; он имеет правительственные и ведомственные награды: медаль ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, медаль «За выдающийся вклад в развитие Кубани».

# I. ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИВОТНОВОДСТВА

Алипер Т.И.

*Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits prepares.  
В области исследований случай благоприятствует только подготовленному уму.*

*Луи Пастер*

## 1. КОНЦЕПЦИЯ «ЕДИНОГО ЗДОРОВЬЯ»

Драматические события уходящего года неизбежно возвращают нас к одному из важнейших феноменов мироздания — взаимодействию микро- и макромира.

Окружающий нас мир живой природы чрезвычайно удивителен и разнообразен. По современным представлениям он насчитывает 1 659 420 описанных видов (включая 133 692 ископаемых вида), которые относятся к 40 типам. Среди них на первом месте — тип *Arthropoda*, насчитывает 1 302 809 видов (78,5%). Тип *Craniata*, который объединяет позвоночных, состоит из 86 432 видов, из которых птицы и млекопитающие составляют 11 087 и 16 014 соответственно (Zhang, Z-O., 2013).

Микромир, представленный бактериями и вирусами, насчитывает более 500 000 различных видов. Вирусы, не являясь полноценными организмами, подчиняются всем законам экологии, в частности популяционной генетики. На основании проведенных уникальных фундаментальных исследований свойств вирусов было принято решение о выделении их в отдельное Царство — *Virae* в отличие от других Царств — животных (*Animalia*), растений (*Plantae*), простейших (*Prostota*), бактерий (*Monera*), грибов (*Fungi*).

Два мира — макромир и микромир — имеют единую органическую природу и на протяжении тысячелетий тесно взаимосвязаны друг с другом, составляя основу эволюции. В основе этого взаимодействия лежит явление паразитизма. В этой связи громадный интерес представляют возбудители инфекционных заболеваний, которые передаются от животного к животному либо от животного человеку.

Говоря о значимости явления паразитизма в живой природе, необходимо отметить труды выдающегося исследователя академика Е.Н. Павловского, который в середине 30-х годов прошлого столетия впервые сформулировал учение о природной очаговости инфекционных заболеваний. Он характеризовал паразитизм как форму сожительства, когда один организм (паразит) использует организм хозяина для своей жизнедеятельности. Благодаря усилиям школы академика Павловского были организованы многочисленные экспедиции и расшифрована природа таких инфекционных заболеваний, как клещевой и японский энцефалит, чума, риккетсиозы. Одним из выдающихся учеников Евгения Никаноровича можно назвать и нашего учителя, академика Дмитрия Константиновича Львова, который с честью продолжил изучение эмурдженных заболеваний.



Рис. 1. Е.Н. Павловский (1884–1965)

В последние годы активное развитие получила концепция «Единый мир — единое здоровье». Ярчайшим представителем этого направления является профессор Альберт Остерхаус. Он отмечает, что сложные взаимосвязи между различными биологическими видами (включая человека) привели к формированию т.н. интерфейсов (т.е. системы взаимодействия с внешним миром), работающих по принципу «животное/животное» и «человек/животное», оперирующих как платформы для межвидовой трансмиссии огромного количества патогенов с последующей их адаптацией к новым хозяевам.

На всей планете антропогенные изменения и их влияние на внешнюю среду в настоящее время вышли на беспрецедентный уровень. К главным факторам в этом ряду следует отнести:

- одомашнивание животных и развитие сельского хозяйства;
- урбанизацию;



Группа преподавателей и слушателей 6-го курса кафедры общей биологии и паразитологии ВМОА им. С.М. Кирова, 1955 г..  
Верхний ряд: Чичерин Ю.В., Горовенко А.А., Львов Д.К., Добровольский К.Ф., Каракин А.А..  
Средний ряд: Николаев Б.Н., Смирнов Г.Г., Павловский Е.Н., Гуцевич А.В..  
Нижний ряд: Моторин В.Н., Неделько А.С., Ушаков Н.Н., Шут В.И..

Рис. 2. Академик РАН Д.К. Львов среди учеников Е.Н. Павловского



Рис. 3. Профессор Альберт Остерхаус (директор Научного центра эмерджентных инфекций и зоонозов, г. Ганновер, Германия) — ключевой докладчик IX Международного ветеринарного конгресса, г. Светлогорск Калининградской области

## Единое здоровье: все взаимосвязано

Здоровье населения, животных и растений



Рис. 4. Иллюстрация концепции «Единый мир — единое здоровье»

- индустриализацию;
- колонизацию;
- глобализацию экономики, развитие международной торговли.

Это привело к тому, что человечество столкнулось с возрастанием эмерджентных заболеваний, многие из которых становились причинами пандемий человека и животных. Большинство таких вспышек было спровоцировано вследствие «переплескивания» из диких животных-резервуаров. В качестве примеров можно привести СПИД от шимпанзе, SARS, MERS, COVID-19 от рукокрылых и т.д.

Необходимо отметить, что возрастание числа новых инфекционных заболеваний человека и животных по времени практически совпало с колоссальным прогрессом в гуманной и ветеринарной медицине, а также в науке об обществе. Знаменитый исследователь тем самым выражает надежду, что инвестиции в глубокое понимание процессов интерфейсов «животное/животное» и «человек/животное» в сочетании с современными достижениями иммунобиологии дадут нам изрядное преимущество в борьбе с эмерджентными заболеваниями.

2020-й, високосный год.

Несомненно, он войдет в историю как начало пандемии новой болезни, нового испытания для человечества — COVID-19. Почти через два столетия со дня рождения Пастера, ознаменовавшего возникновение иммунобиологии, мир оказался перед необходимостью скорейшего решения проблемы защиты жителей нашей планеты. Новый коронавирус!!!

В июне 2020 г. ушел из жизни профессор Сергеев Виталий Александрович. Под его началом я начинал свою научную карьеру младшим научным сотрудником ВИЭВа. Тогда

мы решали проблему специфической профилактики трансмиссивного гастроэнтерита свиней — летального заболевания новорожденных поросят, вызываемого представителем семейства *CORONAVIRIDAE*. Наш Учитель тогда говорил: «не дай Бог подобный вирус настигнет человека...».



Рис. 5. Профессор В.А. Сергеев  
(1927–2020 гг.)



Рис. 6. Линда Сайф — ключевой докладчик VIII Международного ветеринарного конгресса. Москва, 2018 г.

В марте 2020 г. ВОЗ объявила COVID-19 пандемией, а уже в конце этого месяца пришла короткая публикация от нашей коллеги из США, академика Национальной академии наук США, почетного профессора Государственного университета штата Огайо Линды Сайф, обобщающая многолетний персональный опыт создания вакцин против коронавирусов животных (L. Saif. Vaccines for COVID-19: perspectives, prospects, and challenges based on SARS, MERS, and animal coronavirus vaccines. Allergy/Immunology, March 2020).

В этом контексте (невероятно, но факт) пророчески сегодня звучат её слова: «...Несмотря на то, что появление коронавирусов, способных вызывать пневмонию с летальным исходом у взрослых людей, повергло в изумление мировое сообщество медиков, специалисты в области ветеринарной науки были хорошо осведомлены о способности коронавирусов пересекать межвидовые барьеры, появляясь в виде новых штаммов и вызывать острые энтериты и респираторные заболевания у животных...». И далее: «Сценарии адаптации коронавирусов к организму человека подтверждают необходимость исследований для идентификации механизмов и дополнительных факторов возникновения и повторных волн распространения коронавирусов, их межвидовой трансмиссии; патогенеза заболеваний, а также разработки стратегий контроля респираторных коронавирусов млекопитающих» (доклад Л. Сайф «Вновь возникающие коронавирусы человека и животных», материалы VIII Международного ветеринарного конгресса, Москва, 2018 г.).

Так сложилось, что вся моя научная и практическая деятельность связана с изучением и поиском средств специ-

фической профилактики инфекционных болезней животных. Ранее вышли в свет два сборника, посвященных актуальным инфекционным болезням мелких домашних животных (2017 г.) и свиней (2019 г.). Настоящий труд является попыткой представить современные сведения об актуальных болезнях крупного рогатого скота, включая, в том числе, и результаты наших собственных исследований.

## **2. ИСТОРИЯ ОДОМАШНИВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

*Земля рождена в час Быка.*

Старый китайско-русский словарь  
епископа Иннокентия, 1861

Человек (*Homo sapiens*) как вид, которого нобелевский лауреат Питер Медовар называет Великий Дилетант, вряд ли в ближайшее время претерпит эволюционные изменения. Выйдя из Царства живой природы и отделившись от животных, Человек научился доминировать над ними с целью извлечения максимальных благ для себя, т.е. совершил процесс одомашнивания: животные стали надежными помощниками в жизни, источником продуктов питания и частью среды обитания. В этом контексте наиболее благодатной иллюстрацией такого симбиоза может служить одомашнивание крупного рогатого скота.

Крупный рогатый скот (лат. *Bos taurus taurus*) представляет собой одомашненный подвид дикого быка (*Bos taurus*), геном которого имеет 30 пар хромосом. В настоящее время на планете насчитывается свыше 1,3 млрд голов КРС, широко распространен-

ных практически во всех географических зонах. Разводится крупный рогатый скот для целей получения мяса, молока, кожи. Лактирующая корова представляет собой удивительным образом устроенную автономную биофабрику по синтезу молока — уникально сбалансированного секрета, максимально приближенного по составу к женскому молоку. А выражение «здоров как бык» максимально образно отражает состояние здоровья человека.

Процесс одомашнивания крупного рогатого скота начался более 10 тысяч лет назад, когда волки встали на путь превращения в собак, и не прекращается по сей день. Приручение и одомашнивание диких животных стало одним из главных событий так называемой неолитической революции, в ходе которой человечество перешло от присваивающего хозяйства (то есть быта охотников и собирателей) к производящему.

Одомашнивание коров началось также во времена раннего неолита — вслед за одомашниванием коз, овец и свиней. Происходило оно в треугольнике Алтай — Индия — Передняя Азия; при этом в Передней и Центральной Азии объектом одомашнивания служил тур, а на территории Индостана и прилегающих районов — зебу. Скорее всего, такое первенство объяснимо тем, что быки очень миролюбивы, спокойны, послушны и сильны — могут исполнять любую тяжелую работу, а самки дают вкусное и жирное молоко, причем его гораздо больше, чем нужно теленку. Внешне тур напоминал быков, которых сегодня разводят в Испании для корриды. Неолитические жители выращивали своих коров ради мяса, молока и шкур; кроме того, их использовали как тягловую силу; в течение многих столетий волы служили

основными тягловыми животными и во многих странах остаются ими в настоящее время. Молекулярно-генетический анализ данных находок позволяет сделать вывод, что всё поголовье нынешних коров произошло от туров, приручённых в этих регионах. Современные европейские породы, в сравнении с первыми одомашненными, стали значительно меньше в габаритах (за три тысячи лет размер животных уменьшился примерно на треть).

История человечества накопила колоссальный багаж мифов, эпосов, легенд, сказок, пословиц и поговорок, связанных с крупным рогатым скотом. Колоритное высказывание на эту тему мы встречаем в сборнике русских народных сказок А.Н. Афанасьева, крупнейшего собирателя и исследователя этого нетленного фольклора: «... является бык печеный, в заду чеснок толченый, и сороковая бочка хорошего пива...».

На древнем Востоке и в некоторых странах до сих пор корова является священным животным, символизирует плодородие и богатство. В Библии существует глава, где сон фараона предвещал семь голодных и семь богатых лет в виде явившихся ему семи тощих и семи жирных коров.



Рис. 7. Божественный древнеегипетский бык Апис



Рис. 8. Тициан Вечеллио  
«Похищение Европы», 1560–1562 гг.

Древние египтяне обожествляли быка, именовался он Апис. В честь этого животного в Мемфисе был возведен величественный храм, при котором всегда жили черные быки с белым пятном во лбу. Это символизировало солнце, выходящее из мрака. Во время праздника божественного Аписа жрецы водили быка по улицам города и принимали подношения от жителей. Когда бык достигал определенного возраста, его закалывали и меняли на молодого бычка. В Древней Греции быка считали символом верховного божества — Зевса. Полагалось, что именно в виде этого величественного животного всемогущий громоверхец посещает бренную землю, а в очередном своем перевоплощении Зевс похитил красавицу Европу. До настоящего времени в Индии корова считается священным животным, поэтому индузы не употребляют говядину в пищу.

Селекционеры-генетики и другие ученые неустанно работают над выведением новых пород животных разных направлений — мясного, мясо-молочного и молочного. Сегодня невозможно представить себе жизнь человека без крупного рогатого скота и производимой им продукции.

### 3. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ОТРАСЛИ МОЛОЧНОГО И МЯСНОГО ЖИВОТНОВОДСТВА

*Между сортами человеческой еды в исключительном положении находится молоко, приготовленное самой природой.*

И.П. Павлов

*Roast beef medium is not only a food.  
It's philosophy*

*(Ростбиф — это не только пища.  
Это — философия)*

Edna Ferber

В целом животноводство и один из его ключевых аспектов — защиту здоровья животных можно полноценно понять, лишь рассматривая их на глобальном уровне. В масштабах всего мира текущая ситуация максимально благоприятствует развитию и увеличению объемов производства продуктов животного происхождения в развивающихся странах по сравнению с развитыми.

В мире на долю скота мясных пород приходится 40% всего поголовья; при этом мясное скотоводство обеспечивает примерно 55% мирового производства говядины. Лидерами стран, в структуре поголовья КРС которых доминирует мясной скот, являются Австралия — 92%, Канада — 85% и США — 78%. В РФ этот показатель составляет лишь 15%, при этом основным источником получения говядины являются выбракованные коровы и сверхремонтный молодняк молочных стад. Согласно данным Национального союза производителей говядины, общее производство говядины в России в 2019 г. составило 1620 тыс. тонн; из них лишь четверть произведена отраслью мясного скотоводства и примерно столько же (400 тыс. тонн) было импортировано.



Рис. 9. Структура поголовья крупного рогатого скота в РФ

Принимая во внимание вышесказанное, а также тот факт, что 69% поголовья КРС выращивается в фермерских и личных подсобных хозяйствах, становится очевидной необходимость интенсивного развития отрасли за счет внедрения технологий выращивания животных по принципу полного цикла и создания современной инфраструктуры убоя и переработки. Основу этого должна обеспечить национальная программа увеличения маточного поголовья КРС до 3–4 млн голов.

Согласно прогнозам, население Земли увеличится на 1,8 млрд к 2025 году. По сравнению с данным показателем в 2000 году рост составит 30%. Подсчитано, что 95% данного прироста будет иметь место в развивающихся странах, где уже проживает 79% населения нашей планеты. В настоящее время 1,2 млрд человек живут в абсолютной бедности, менее чем на 1 доллар США в

день, и 2,8 млрд человек — менее чем на 2 доллара США в день. Последняя сумма эквивалентна субсидиям на 1 молочную корову в ЕЭС. Около 800 млн человек страдают от недоедания, большинство их проживает в сельской местности, однако возрастает число таких людей и в городах, где отсутствие продуктов животноводства приводит к развитию дефицита незаменимых аминокислот, микроэлементов и витаминов. Критическое значение имеет отсутствие доступа к молоку, так как молочные продукты необходимы, чтобы извлечь максимальную возможную пищевую ценность в случаях, когда основу рациона составляют зерновые: без молока переваривается лишь 30% белка, содержащегося в зерновых.

Очень быстро растет городское население, что означает более плотную концентрацию хозяйств, интенсификацию производства и таит в себе угрозу для

Таблица 1. Мировое производство мяса и молока в 2018 г. (ТОП-10)

№пп	Страна	Количество мяса, млн т	Страна	Количество молока, млн л
1	США	12,22	США	98,70
2	Бразилия	9,90	Индия	89,83
3	Китай	5,81	Бразилия	33,84
4	Аргентина	3,06	Германия	33,06
5	Австралия	2,22	Китай	31,16
6	Мексика	1,98	Россия	30,35
7	Россия	1,61	Франция	25,54
8	Франция	1,43	Новая Зеландия	21,40
9	Канада	1,23	Турция	20,04
10	Германия	1,12	Пакистан	16,72

здоровья населения. Эта быстрая перемена в производственных системах в сложной социополитической, экономической и экологической обстановке сопровождается риском появления новых заболеваний и возникновения новых микроорганизмов, способных вызывать вспышки заболеваний и препятствовать международной торговле. Несмотря на то, что ВТО были утверждены правила охраны здоровья животных, данный процесс не удается полностью сдержать.

Несмотря на то, что три четверти КРС нашей планеты обитает в разви-

вающихся странах, они дают лишь 56% производимой в мире говядины и 48,6% производимого молока, то есть уровень производства говядины в пересчете на одну корову в развитых странах в 3,4 раза выше. Для другой продукции животноводства наблюдается похожая картина. Повышение продуктивности будет долгим и трудным процессом, а чтобы оно стало возможным, потребуется задействовать все методы улучшения состояния здоровья животных.

В развитых странах уровень потребления мяса составляет 81,3 кг в год на человека. Несмотря на то, что чрезмерное



Рис. 10. Мировое производство молока в 2018 г.



Рис. 11. Молочная продуктивность коров в Российской Федерации

потребление мяса считается фактором, повышающим риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых видов рака, в развивающихся странах данный показатель, к сожалению, составляет лишь 28,6 кг в год на человека, а в Африке — к югу от Сахары — и во все 13,4 кг в год на человека. Для молока различия еще значительнее: 247 и 54,4 кг соответственно, и 32,3 кг в Африке к югу от Сахары. Таким образом, потребление белка в развивающихся странах является и будет являться в будущем серьезной

причиной для беспокойства: оно составляет 21 г на человека в день и 11 г в Африке к югу от Сахары по сравнению с 64 г в развитых странах.

Отрасль молочного животноводства является важнейшим драйвером в реализации Доктрины продовольственной безопасности нашей страны. Согласно данным департамента животноводства МСХ РФ, в настоящее время Россия занимает 7-е место в ТОП-10 мировых производителей молока с объемом производства 30,6 млн тонн.



Рис. 12. Реализация доктрины продовольственной безопасности страны (данные МСХ)

Несмотря на существенный прогресс в увеличении молочной продуктивности, отрасль по-прежнему остается импортозависимой: наша страна обеспечена молоком лишь на 75% (вместо требуемых 90%).

Таким образом, для преодоления отставания отрасль должна развиваться по интенсивному пути, где наряду со строительством новых высокотехнологичных ферм, прогрессивным использованием достижений генетики и селекции, полноценного кормления, важную роль должно играть профессиональное ветеринарное обеспечение (главным образом благополучие по инфекционным заболеваниям).

## 4. ПРИКЛАДНАЯ ИММУНОЛОГИЯ НА СЛУЖБЕ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ

*Каждое научное поколение открывает в прошлом новые черты.*

*Случайное и неважное в глазах ученых одного десятилетия получает в глазах другого нередко крупное и глубокое значение.*

*Поэтому в истории науки постоянно приходится возвращаться к старым сюжетам, пересматривать историю вопроса, вновь ее строить и переделывать.*

В.И. Вернадский

На протяжении всей своей истории человечество неизбежно сталкивалось с инфекционными заболеваниями. Взаимодействие макро- и микромира является неотъемлемой частью функционирования биосферы. Особое внимание при этом, по мнению академика Львова Д.К., должно быть обращено на изучение эволюции микроорганизмов и их хозяев с точки зрения формирования прогноза намечающихся тенденций и событий

(Д.К. Львов «Новые и возвращающиеся инфекции — угроза биологической безопасности», доклад на VIII Международном ветеринарном конгрессе, Москва, 2018 г.).

Одним из базисных принципов биологии является принцип биогенеза: все живое происходит от живого. На всех этапах эволюции представители (популяции) макро- и микромира находятся в постоянном взаимодействии друг с другом. В этом контексте совершенно очевидно: понятия инфекция и иммунитет составляют две стороны такого явления, как инфекционный процесс, или инфекционное заболевание.

Инфекция (от лат. *Infectio* — ‘заржение’) — состояние зараженности макроорганизма, сопровождающееся комплексом биологических реакций. Инфекция может проявляться в различных формах — от инаппаратной до клинически выраженной. Для того чтобы человек или животное заразилось инфекционной болезнью, необходим контакт с больным либо переносчиком болезни. Передача возбудителя от одного животного другому получила название эпизоотического процесса. Эволюционно сложился трехзвенный механизм эпизоотического процесса:

- 1) источник возбудителя процесса;
- 2) механизм передачи;
- 3) восприимчивый организм.

Иммунитет (от лат. *Immunitas* — ‘освобождение от чего-либо’) долгое время оценивался как невосприимчивость макроорганизма к инфекционным болезням. В настоящее время под иммунитетом понимают способ защиты организма от всех антигенно-чужеродных веществ как экзогенной, так и эндогенной природы — вирусов, бактерий, грибов, паразитов и мутационно измененных клеток. Биологический смысл иммунитета — обеспечение структурной и функциональной целостности организма.

История изучения инфекции и иммунитета прошла сложный интересный путь — от древних египетских папирусов и кодекса Хаммурапи к пониманию природы организма у Гиппократа (фюзис) и «жизненной силы» у Галена, далее к «теории контагии» Фракасторо и анатомической концепции болезней Дж. Морганьи, далее к оспопрививанию Дженнера и золотой эре иммунологии гениального Пастера.

Ретроспектива изучения инфекционных болезней и понимания природы болезнетворных микробов относит нас на много тысячелетий назад (*табл. 2*).

Несомненно, прогресс прикладной иммунологии оказался неизбежно связан с развитием других фундаментальных дисциплин, в первую очередь физики и химии. Открытие университетов и ветеринарных школ в XVII–XVIII вв. оказалось колossalное влияние на этот процесс.

Несмотря на вышесказанное, по-настоящему своему обозначенному рождению, становлению и дальнейшему прогрессу иммунология как прикладная дисциплина обязана фундаментальным открытиям легендарных исследователей Эдварда Дженнера, Луи Пастера, Роберта Коха и Эмиля фон Беринга.

**Таблица 2. Хронология важнейших этапов понимания природы инфекционных болезней**

1700 г. до н.э.	«Кодекс Хаммурапи» (свод законов для врачей)
IV в. до н.э.	Гиппократ (460–377 гг. до н.э.) «О природе человека», «О болезнях», «О древней медицине» — введение понятия эпидемии — природа — враг болезней — теория гуморальной патологии (соков)
1020 г.	Авиценна «Канон медицины» — «Тело может заражаться инородными телами» — первое понимание значимости карантина
1546 г.	Джилорамо Фракасторо «Теория контагии»
1668 г.	Антоний ван Левенгук (первый микроскоп) — открытие микробов (т.н. «анималкулюс»)
1761 г.	Джованни Батиста Морганьи «О локализации и причинах болезни», анатомическая концепция болезни

Говоря о связи поколений в науке и значимости рассматриваемых научных школ, определивших на столетия вперед развитие прикладной иммунологии, хочется привести слова Луи Пастера: «Благословен тот, кто носит в себе божественный идеал и повинуется ему — идеалу искусства науки, евангельских добродетелей. Именно здесь коренятся источники великих мыслей и великих действий. Наука приближает людей к Богу».

Необходимо отдать должное и одному из самых талантливых учеников Пастера — доктору Марселю Мерьё, который стоял у истоков создания первой в мире биотехнологической компании «Рон-Мерьё». Говоря о Пастеровской школе, нельзя не привести слова выдающегося академика М.П. Чумакова, написанные им в предисловии книги Шарля Мерьё «Вирус открытия»: «Мой дорогой и большой друг Шарль Мерьё действительно является убежденным последователем школы великого Пастера. Через своего отца Марселя Мерьё, работавшего в 1894 году биохимиком в Институте Пастера под руководством знаменитого доктора Эмиля Ру вместе с нашими великими соотечественниками И.И. Мечниковым и Н.Ф. Гамалеей, он впитал страсть к открытиям и использованию биотехнологических возможностей для

<p><b>ЭДВАРД ДЖЕННЕР</b> (1749-1823)</p> <p><b>РОЖДЕНИЕ ВАКЦИНОЛОГИИ</b></p> <p>Посвятил жизнь борьбе с оспой – смертельной угрозой для человечества.</p> <p>Установил феномен легкого течения оспы у доярок, переболевших коровьей оспой.</p> <p>Провел первую в мире прививку оспы Джеймсу Филлipsу.</p> <p>Автор книги «Размышления о причинах и последствиях Variolae Vaccinae, или коровьей оспы».</p> <p>Основал Институт оспопрививания и Королевское Дженнеровское общество.</p> <p>Дженнеру человечество обязано началом эры вакцинации.</p>	<p><b>ЭМИЛЬ ФОН БЕРИНГ</b> (1854-1917)</p> <p><b>РОЖДЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОЙ ТЕРАПИИ</b></p> <p>Посвятил жизнь изучению смертельных инфекционных болезней, в первую очередь, дифтерии и столбняка.</p> <p>Обнаружил феномен образования антитоксинов в ответ на введение слабопатогенных штаммов бактерий.</p> <p>Начало эры пассивной иммунизации.</p> <p>Первая в мире Нобелевская премия в области физиологии и медицины: «За работу по сывороточной терапии, главным образом за ее применение при лечении дифтерии, что открыло новые пути в медицинской науке и дало в руки врачей победоносное оружие против болезни и смерти» (1901 г., вместе с К. Сибасабуро).</p> <p>Основал Институт экспериментальной терапии, а в последующем биотехнологическую компанию по производству сывороточных и вакцинальных препаратов.</p> <p>Известные ученики: Й. Фибигер</p>
<p><b>ЛУИ ПАСТЕР</b> (1822-1895)</p> <p><b>«БЛАГОДЕТЕЛЬ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА»</b></p> <p><b>МИРОВОЕ ПРИЗНАНИЕ ИММУНОЛОГИИ</b></p> <p>Самая грандиозная фигура в борьбе с инфекционными болезнями человека и животных.</p> <p>Открытие стереометрии, пионерские работы по стереохимии винной кислоты.</p> <p>Доказательство биологической природы брожения, пастеризация, крах теории самозарождения микробов.</p> <p>Доказательство инфекционной природы болезни шелковичных червей, спасение производства шелковых тканей во Франции.</p> <p>Начало золотой эры прикладной иммунологии; разработка эффективных вакцин против холеры кур, сибирской язвы, бешенства.</p> <p>Основатель Пастеровского института, создатель Пастеровской школы.</p> <p>Известные ученики: Ш. Фридель, Ш. Шамберлен, Э. Ру, А. Кальмет, М. Мерье, И.И. Мечников, Н.Ф. Гамалея.</p>	<p><b>РОBERT KOХ</b> (1843-1910)</p> <p><b>«БОЕЦ СО СМЕРТЬЮ»</b></p> <p><b>МИРОВОЕ ПРИЗНАНИЕ МИКРОБИОЛОГИИ</b></p> <p>Разработка и внедрение революционных бактериологических методик: окраска бактерий, иммерсионный объектив (метод высаживаний капли), изобретение твердых питательных сред. В 1400 раз увеличена разрешающая способность микроскопа и сконструирован первый термостат.</p> <p>Расшифровка этиологии и инфекционного процесса при сибирской язве и туберкулезе.</p> <p>Революционные «постулаты Коха».</p> <p>Новые подходы к борьбе с холерой: кипячение и фильтрация питьевой воды.</p> <p>Знаменитые научные экспедиции в Судан и Новую Гвинею, а также Германскую Восточную Африку.</p> <p>Впервые описан феномен приобретенного иммунитета.</p> <p>Нобелевская премия в области физиологии и медицины за исследования по туберкулезу (1905 г.).</p> <p>Известные ученики: Э. ф. Беринг, К. Сибасабуро, П. Эрлих, Ф. Леффлер и П. Фрош.</p>

Рис. 13. Ученые, определившие возникновение и развитие прикладной иммунологии



Рис. 14. М. Мерьё (1870–1937)



Рис. 15. И.И. Мечников (1845–1916)



Рис. 16. Н.Ф. Гамалея (1859–1949)

успешной защиты от патогенных микробов и вирусов».

Таким образом, к началу XX века были созданы все необходимые теоретические и практические предпосылки для дальнейшего стремительного роста и развития прикладной иммунологии. Научные школы, созданные гением Пастера и Коха, ошеломили мировое сообщество целым фейерверком блестательных новых открытий. Возникла целая новая отрасль — индустриальное производство биологических препаратов для профилактики и лечения инфекционных болезней человека и животных. В настящее время благоденствие человечества немыслимо без вакцинальных и сывороточных препаратов.

Впечатляющие открытия в области иммунологии, сделанные в последующем в XX и XXI веках, в значительной степени предопределили и достижения в прикладных исследованиях (табл. 3).

## 5. ВАКЦИНАЦИЯ — КЛЮЧ К ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА

*Ум заключается не только в знании, но и в умении прилагать знания на деле.*

Аристотель

Вакцинопрофилактика по праву считается одним из крупнейших достижений биологии. Характерная черта развития биологии на современном этапе — стремительное преодоление расстояния, отделяющего фундаментальные открытия от их практического применения. Этот процесс наиболее отчетливо проявляется в области разработки средств специфической профилактики инфекционных заболеваний. В настящее время трудно назвать область биологической науки, где бы столь же

Таблица 3. Открытия, определившие прогресс в вакцинологии

Этап	Периоды	Открытия	Авторы, школа
I	80-е гг. XIX в. — 40-е гг. XX в.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Рождение вакцинологии</li> <li>• Клеточная теория иммунитета</li> <li>• Гуморальная теория иммунитета</li> <li>• Аллергия, анафилаксия</li> <li>• Открытие вирусов</li> </ul>	Пастер Мечников Беринг, Эрлих Кох, Пирке, Рише Ивановский
II	50–80-е гг. XX в.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Двойная спираль (ДНК)</li> <li>• Иммунологическая толерантность</li> <li>• Селекционно-клональная теория</li> <li>• Химическая структура антител</li> <li>• Гены и молекулы главного комплекса гистосовместимости</li> <li>• Рождение клеточной биотехнологии: <ul style="list-style-type: none"> <li>о культуры клеток</li> <li>о масштабное выращивание вирусов в культуре клеток</li> <li>о вакцина против полиомиелита</li> <li>о моноклональные антитела</li> <li>о вакцина против ящура</li> </ul> </li> </ul>	Уотсон, Крик Медавар Бернетт Эдельман, Портэр Бенацерраф, Доссе, Сиелл  Дульбекко Эндерс Сэбин, Чумаков Келлер, Мильштейн Френкель
III	80-е гг. XX в. — настоящее время	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Рождение генно-инженерной технологии: <ul style="list-style-type: none"> <li>о полимеразная цепная реакция</li> <li>о ДНК-вакцины</li> <li>о рекомбинантные вакцины</li> <li>о пептидные вакцины</li> <li>о обратная генетика</li> </ul> </li> </ul>	Мюллис Берг, Коэн Вульф, Фелгнер Села Балтимор

быстро и эффективно использовались новейшие достижения.

Благодаря этому в последние годы достигнуты большие успехи в области вакцинопрофилактики многих опасных вирусных заболеваний. С помощью глобальной вакцинопрофилактики во всем мире искоренена натуральная оспа человека (1979 г.), существует эффективный контроль ряда опасных вирусных заболеваний людей (полиомиелит, корь, грипп, бешенство, гепатиты и др.) и животных (ящур, чума свиней, чума жвачных и плотоядных, болезнь Марека, ньюкаслская болезнь и др.).

Подобно вакцинации против оспы, вакцинация против бешенства сыграла очень важную роль в истории вакци-

нопрофилактики и является хорошим примером развития в этой области науки с момента зарождения до наших дней, ярко демонстрируя достижения, особенно в обеспечении безопасности. Первая публикация Луи Пастера, посвященная бешенству, относится к 1881 году. В ней он описал содержание вируса в слюне и чувствительность кроликов к экспериментальному заражению вирусом бешенства. Четырьмя годами позже Л. Пастер и Э. Ру сообщили, что при пассировании на кроликах вирус снижает вирулентность и может быть использован для вакцинации. Вирус бешенства, выделенный из мозга больной коровы, они пассировали интракраниально на кроликах в течение 90 пассажей, отме-



Рис 17. Луи Пастер наблюдает за введением вакцины

тив сокращение инкубационного периода с 15 до 7 дней, после чего он сохранял свои свойства («фиксированный вирус»). Такой вирус в сухой атмосфере при комнатной температуре терял вирулентность и создавал иммунитет у собак к уличному вирусу бешенства. Родилась вакцинология.

Создание высокоеффективных вакцин и широкомасштабных методов их производства позволили разработать национальные и международные программы контроля и искоренения ряда вирусных заболеваний человека и животных.

Профилактика многих болезней животных достигла исключительно широких масштабов и стала неотъемлемой частью технологии ведения животноводства, особенно на индустриальной основе. Например, инактивированную вакцину против ящура и живую вакцину против ньюкаслской болезни изготавливают в количестве, исчисляемом многими миллиардами доз. Предотвращенный экономический ущерб, благодаря применению вакцин, достигает огромных размеров. Только отмена прививок

против оспы людей в связи с ликвидацией болезни позволила сэкономить многие миллиарды долларов США.

В настоящее время в медицинской и ветеринарной практике широко применяют живые и инактивированные вакцины, производство которых основывается на современных достижениях биологической науки и технологических разработок. Производство и методы контроля таких препаратов стали довольно сложными и трудоемкими, значительно возросло их качество и безопасность применения. У живых вакцин основные трудности связаны с получением стабильного иммуногенного вакцинного штамма возбудителя и разработкой методов его контроля. При изготовлении инактивированных вакцин основной проблемой является получение большого количества безопасного антигена, по возможности в неденатурированном и концентрированном виде. Существует большое разнообразие в способах изготовления живых и инактивированных вакцин. В живой вакции вирус либо бактерия сохраняют потенциальную способность изменяться в сторону снижения антигенности или повышения реактогенности или даже вирулентности. В культуре клеток и куриных эмбрионах, используемых в качестве субстратов для размножения вакцинных штаммов, могут присутствовать другие, трудно обнаруживаемые вирусы, загрязняющие вакцину. В инактивированной вакцине исходный материал может быть обезврежен не полностью, и, как следствие, ее производство таит в себе опасность попадания возбудителя во внешнюю среду.

Успехи в области изучения функциональной роли вирусных и бактериальных антигенных детерминант открывают принципиально новые возможности для создания и усовершенствования вакцин. Установлено, что иммунный ответ при

вирусных инфекциях направлен не на вирус как таковой и даже не на вирусный белок, а лишь на небольшое количество антигенных детерминант, представляющих не всю белковую молекулу, а только отдельные участки. С учетом этого разрабатываются вакцины из отдельных компонентов, получаемых путем расщепления вирусных или бактериальных клеток либо генно-инженерными методами.

Эффективная иммунизация организма против инфекций тесно связана с их пато- и иммуногенезом, поэтому рациональное проведение вакцинации, а также максимальная ее эффективность требуют изучения иммунологических и патогенетических основ инфекционного процесса.

Современной науке известны сотни видов патогенных вирусов и бактерий, избирательно поражающих различные системы организма человека и животных. Природное многообразие инфекционных болезней вызывало необходимость наряду с санитарно-гигиеническими мерами прибегнуть к специфической профилактике с использованием широкого круга вакцинных препаратов. Несмотря на большое разнообразие микроорганизмов и вызываемых ими заболеваний, имеются общие принципы приготовления и применения вакцин. Однако в настоящее время не все вирусные и бактериальные болезни в одинаковой степени удается контролировать с помощью вакцинации.

Результаты вакцинации всегда оценивали по защите от последующего заражения гомологичным вирулентным (полевым) штаммом вируса или бактерии («золотой стандарт»). Вакцинация считается эффективной, если она исключает приживление и размножение патогена или ограничивает его размножение в месте внедрения и предотвращает распространение к органам-мишеням.

Вакцинация должна сопровождаться развитием иммунологической памяти. В идеале это поддержание специфических антител в высокой концентрации в сыворотке крови и на месте внедрения микроорганизма. В то же время Т-клетки, ответственные за специфический клеточный иммунитет, должны находиться в состоянии готовности быстро синтезировать свои летальные для инфекционного агента продукты (т.н. гранзимы и перфорины), когда происходит инфицирование.

История вакцинологии насчитывает более трех столетий, начиная с эмпирических подходов Дженнера, далее — золотая эра, связанная с открытиями Пастера, и, наконец, современный период триумфа молекулярно-биологических и генно-инженерных биотехнологий. Наиболее рельефно путь, пройденный человечеством по разработке и внедрению вакцинных препаратов, на наш взгляд, отражен в нижеприведенной табл. 4 (С. Плоткин, «Краткая история вакцинации», Vaccine, 2017). В этом материале все вакцины разделены на 4 группы: живые; убитые полнокомпонентные вакцины; компонентные вакцины, содержащие нативные протеины или полисахариды, и генно-инженерные.

#### **1. Живые реплицирующиеся вакцины:**

— вакцины из природно-ослабленных или гетерологичных микроорганизмов;

— вакцины из вирусов и бактерий, аттенуированных пассажами в гетерологичных организмах или в культурах клеток при обычной или пониженной температуре или реассортацией вирусных генов.

#### **2. Нереплицирующиеся вакцины, содержащие природные целостные антигены:**

— вакцины из инактивированных целых вирионов либо бактерий.

Таблица 4. Главные вехи в развитии вакцинологии (вакцины для людей)

<i>Вакцины на основе живых аттенуированных микроорганизмов</i>	<i>Вакцины на основе инактивированных цельных микроорганизмов</i>	<i>Вакцины на основе нативных белков и полисахаридов</i>	<i>Вакцины, полученные методами генной инженерии</i>
<b>XVIII век</b>			
Оспа (1798)			
<b>XIX век</b>			
Бешенство (1885)	Брюшной тиф (1896) Холера (1896) Чума (1897)		
<b>XX век, первая половина</b>			
Туберкулез (БЦЖ) (1927)	Коклюш (1926)	Дифтеритический анатоксин (1926)	
Желтая лихорадка (1935)	Грипп (1936) Сыпной тиф (1938) Клещевой энцефалит (1937)	Столбнячный анатоксин (1926)	
<b>XX век, вторая половина</b>			
Полиомиелит (оральная) (1963)	Полиомиелит (инъекционная) (1955)	Пневмококковая инфекция (на основе полисахарида) (1977)	Гепатит В (на основе рекомбинантного поверхностного антигена) (1986)
Корь (1963)	Бешенство (культуральная вакцина) (1980)	Менингококковая инфекция (на основе полисахарида) (1974)	Болезнь Лайма (на основе поверхностного антигена OspA) (1998) <sup>b</sup>
Свинка (1967)	Японский энцефалит (из мозга мыши) (1992) <sup>b</sup>	Гемофилезная инфекция ( <i>H. influenzae</i> ) типа b (на основе полисахарида) (1985) <sup>b</sup>	Холера (на основе рекомбинантного токсина В) (1993)
Краснуха (1969)	Клещевой энцефалит (1981)	Менингококковая инфекция (на основе конъюгата группы C) (1999) UK <sup>a</sup>	
Аденовироз (1980)	Гепатит А (1996)	Гемофилезная инфекция ( <i>H. influenzae</i> ) типа b (на основе конъюгата) (1987) <sup>a</sup>	
Брюшной тиф ( <i>Salmonella</i> Ty21a) (1989)	Холера (WC-rBS) (1991)	Гепатит В (из производных плазмы) (1981)	
Ветряная оспа (1995)		Брюшной тиф (Vi) (на основе полисахарида) (1994)	
Реассортанты ротавируса (1999)		Коклюш (на основе бесклеточного антигена) (1996)	
Холера (аттенуированная) (1994) <sup>b</sup>		Сибирская язва (бесклеточная на основе фильтрата антигенов) (1970)	
<b>XXI век</b>			
Грипп (на основе холодаадаптированного штамма) (2003)	Японский энцефалит (на культуре клеток Vero) (2009)	Пневмококковая инфекция (семивалентная на основе конъюгата) (2000) <sup>a</sup>	Рекомбинантная вакцина против вируса папилломы человека 4-валентная (2006)
Ротавирус (аттенуированный и новые реассортанты) (2006) Ротавирус (моновалентная) (2008) Холера (оральная) (2016)	Холера (только WC) (2009)	Пневмококковая инфекция (13-валентная на основе конъюгата) (2010)	Рекомбинантная вакцина против вируса папилломы человека 2-валентная (2009) Вакцина против вируса папилломы человека 9-валентная (2014) Менингококковая инфекция тип В (Н фактор) (2014) Менингококковая инфекция тип В (разработана при помощи реверсивной вакцинологии) (2015)
Опоясывающий лишай (2006)		Менингококковая инфекция (4-валентная на основе конъюгата) (2005) <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> конъюгат оболочечного полисахарида для переноса протеина;

<sup>b</sup> непродолжительного действия.

**3. Вакцины, полученные на основе нативных белков и полисахаридов:**

— вакцины на основе вирусных белков, выделенных из плазмы крови (например вакцина против гепатита В), либо вакцины на основе бактериальных токсинов и полисахаридных антигенов бактерий.

**4. Вакцины, полученные при помощи методов генной инженерии:**

- вакцины из структурных вирусных белков;
- вакцины, полученные за счет экспрессии вирусных антигенов с помощью вирусных векторов;
- ДНК-вакцины;
- вакцины из вирусных белков, собранных в вирусоподобные частицы (VLP).

Современное биологическое производство, как правило, подразумевает использование габаритного оборудования — ферментеров или биореакторов, объем которых может достигать до 5000 литров. В этих сосудах, благодаря применению искусственных питательных сред и созданию оптимальных условий (температура, рН, ЕН, перемешивание, добавление газов и т.д.), происходит процесс культивирования вирусов и бактерий, которые в последующем и составят активную (антигеннную) основу будущих вакцин.



Рис. 18–22. Новые участки производственной площадки ООО «Ветбинохим»  
(Технополис, Москва)

В отличие от инактивированных вакцин, таких как, например, против ящура и лептоспироза, выпускаемых в больших количествах, при многих заболеваниях человека и животных применяют живые вакцины, для изготовления которых не требуется большого количества вирусного и бактериального сырья. Ежегодно производство таких вакцин, связанное с получением сотен литров полуфабриката, содержащего антиген с заданными параметрами, удовлетворяется использованием статических или врачающихся культуральных сосудов. Однако такие способы культивирования не могут обеспечить крупномасштабное производство ряда вирусных вакцин. Поэтому, например при изготовлении противоящурной вакцины, перевиваемые клетки выращивают в суспензии в реакторах с рабочим объемом более 1000 л. Крупные научно-производственные центры Южной Америки ежегодно вырабатывают до 600 млн доз монovalентной инакти-

вированной противоящурной вакцины. Для этой цели необходимо еженедельно получать около 20 000 л суспензионной культуры клеток ВНК-21.

Говоря о современных способах получения высокоактивного сырья для вакцин, нельзя не упомянуть волновую технологию выращивания клеток и вирусов (biowave) или совершенство фантастическую технологию использования в качестве природных культиваторов личинок насекомых. Последняя по своей сути является модификацией получения рекомбинантных белков с использованием бакуловирусных систем экспрессии и перевиваемых линий клеток насекомых (например SF-2). В настоящее время эта технология коммерциализирована и реализуется биотехнологическими компаниями, в том числе компанией ALGENEX, которую нам удалось посетить несколько лет назад (рис. 23).

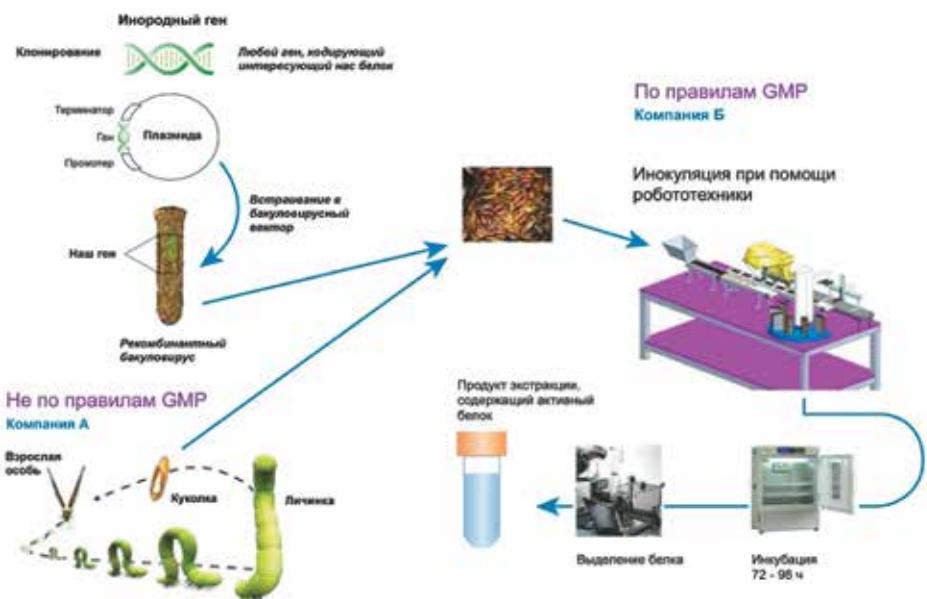


Рис. 23. Классическая и роботизированная технология получения рекомбинантных белков в клетках и организмах (личинках) насекомых



Рис. 24–25. Результат накопления в насекомых флуоресцентных рекомбинантных антигенов в присутствии отрицательного контроля

Мировая индустрия производства биологических препаратов в настоящее время представляет собой крупный бизнес, сконцентрированный главным образом в транснациональных корпорациях:

- Получение специфического компонента (антигена)
- Освобождение антигена от балластных веществ
- Объединение антигена со средой высушивания (в случае живых вакцин) либо с адьювантом и консервантами (в случае инактивированных)
- Розлив во флаконы, предукупорка и лиофилизация (живые вакцины) либо сразу укупорка (инактивированные вакцины)
- Маркировка, упаковка
- Помещение на карантинный склад и проведение контроля качества
- Ввод в гражданский оборот

«Бёрингер», MSD, «Зоетис», «Санофи» и ряда других. Зачастую эти компании разрабатывают и производят вакцины как для человека, так и для животных. Количество доз вакцин, производимых в мире, исчисляется сотнями миллиар-

дов доз. В связи с тем, что современные вакцины представляют собой сложные высокотехнологичные продукты, содержащие биологическое начало, к ним предъявляются исключительно строгие требования на всех этапах: разработки, внедрения, производства и контроля качества.

Возможность безопасного и стабильно соответствующего стандартам производства вакцин зависит от четырех базисных элементов:

1. Регламентированный процесс производства, включающий все этапы.
2. Соответствие организации стандартам, необходимым для успешной реализации процесса производства.
3. Тестирование продукции и операции, подтверждающие квалификацию оборудования и персонала.
4. Разрешение на выпуск и распространение продукции, выданное уполномоченными органами (в нашей стране — Россельхознадзор).

Несмотря на разнообразие способов культивирования микроорганизмов, современное биологическое производство осуществляется в несколько последовательных стадий:

Однако на этом процесс не завершается, т.к. в последующем на эффективность вакцины существенное влияние оказывают условия хранения и транспортирования. Для подтверждения гарантии качества на предприятии организуется архив вакциновой продукции.

Безусловно, в конечном итоге главным арбитром соответствия и эффективности вакцин выступает ветеринарная практика, и зачастую период выведения препарата на рынок и закрепления его в хозяйствах, формирование позитивного имиджа занимают не один год.

## 6. ПРЕДПОСЫЛКИ К НАПИСАНИЮ НАСТОЯЩЕЙ МОНОГРАФИИ

*Греки оставили нам в наследство прекраснейшее слово нашего языка — «энтузиазм», что значит «Бог, который внутри».*

Луи Пастер

### 6.1. Биологическая промышленность и проблемы биологической безопасности

Ежегодно в мире регистрируется свыше 500 тысяч вспышек инфекционных болезней, которые представляют серьезную угрозу благополучию человека и здоровью животных (грипп, ящур, бешенство, губкообразная энцефалопатия и др.). Экономические потери от этих проблем составляют до 20% в экономике развитых стран и до 40% в экономике развивающихся стран. Яркой иллюстрацией этого могут служить потери от эпизоотии ящура в Великобритании в 2001 году, составившие свыше 10 млрд долларов.

В этой связи на первый план выходят вопросы национальной биологической безопасности, в нашем случае вопросы поддержки отрасли производства иммунобиологических препаратов. Во всем мире в основе

управления этими процессами лежит протекционистская идеология: «Нельзя доверять иностранным производителям контролировать производство и распространение средств обеспечения биобезопасности страны, надо формировать, развивать и поддерживать отечественные структуры». Надо сказать, что в СССР была создана мощная ветеринарная служба, располагающая развитой сетью биофабрик, объединенных в БИОПРОМ, возглавляемый длительное время великолепным профессионалом П.П. Рахманиным. В настоящее время, к сожалению, осталось лишь 5 государственных биофабрик, со многими из которых мы поддерживаем профессиональные и дружеские взаимоотношения на протяжении более 25 лет. В первую очередь это изучение передового опыта масштабного выращивания вирусов и бактерий, надлежащей практики производства (GMP), проведение научно-практических семинаров и т.д.

**Свыше 50% рынка ветеринарных вакцин на сегодняшний день занимают иностранные компании, что, несомненно, представляет угрозу национальной безопасности по следующим причинам:**



Рис. 26. П.П. Рахманин (1931–2019) на презентации книги «Воспоминания и размышления ветеринарного врача»



Рис. 27–29. Директора Ставропольской, Армавирской и Курской биофабрик, профессора В.И. Заерко, Е.В. Сусский, В.М. Безгин

✓ Применение живых зарубежных вакцин способствует занесению и распространению новых микроорганизмов, которые могут спровоцировать не прогнозируемые эпизоотии по причине отсутствия естественной резистентности и специфического иммунитета у основного поголовья животных и птиц.

✓ Как следствие этого процесса, из-за отсутствия у российской биопромышленности средств специфической профилактики заболеваний, обусловленных занесенными штаммами патогенов, ликвидация вновь возникающих инфекций потребует именно зарубежных препаратов. То есть круг замыкается. Зарубежные производители сознательно инициируют отечественное животноводство на потребление импортируемых лекарственных средств.

✓ Принимая во внимание актуальную политическую ситуацию, нельзя исключить приостановку импорта биологических препаратов, что может представлять прямую угрозу отечественному животноводству.

Таким образом, для агробиологической отрасли в целом и для нашей компании в частности в ближайшее время становится весьма актуальной программа сохранения и развития отрасли производства биопрепаратов, которая мо-

жет быть выполнена за счет развития следующих направлений:

- стимулирование спроса на отечественную продукцию (в том числе за счет модернизации отечественных предприятий и внедрения передовых биотехнологий);
- повышение конкурентоспособности — выпуск продукции в соответствии с международными требованиями FDA и GMP;
- развитие научных исследований в области биотехнологии и образования;
- содействие взаимодействию бизнеса, образования и науки в области биотехнологии;
- развитие международного сотрудничества;
- максимальное снятие регуляторных барьеров для отечественных биопредприятий.

В указанном направлении предстоит интенсивная работа в ближайшее время, и, по нашему убеждению, здесь может значительно помочь активная позиция по данному вопросу Национальной ветеринарной ассоциации (НВА), объединившей лучших представителей российских фармакологических и биологических предприятий — «АВИВАК», «Апиценна», «Агроветзащита», ВИК, «Ветбиохим», NITA-FARM и др.



Рис. 30. С руководителями крупнейших российских ветеринарных компаний  
С.В. Енгашевым (в центре)  
и А.С. Каспарьянцем (справа)



Рис. 31. С.Н. Вышлесский (1874–1958)

## 6.2. Краткий экскурс в историю изучения инфекционных болезней КРС

Повальные заболевания скота постоянно сопровождали российское животноводство. По-настоящему мощным и действенным инструментом в борьбе с эпизоотиями стали земские станции. Первая мировая и Гражданская войны в значительной мере способствовали росту инфекционных заболеваний, и именно в это время сформировалась школа великолепных исследователей-инфекционистов, организаторов ветеринарного дела Н.А. Михина, В.С. Бобровского и др. Однако по-настоящему научно-обоснованные подходы, правила и принципы борьбы с инфекционными болезнями стали возможными с выделением эпизоотологии в самостоятельную научную дисциплину. Эта страница истории неразрывно связана с именем выдающегося основоположника отечественной эпизоотологии С.Н. Вышлесского.



Рис. 32. Я.Р. Коваленко (1906–1980)

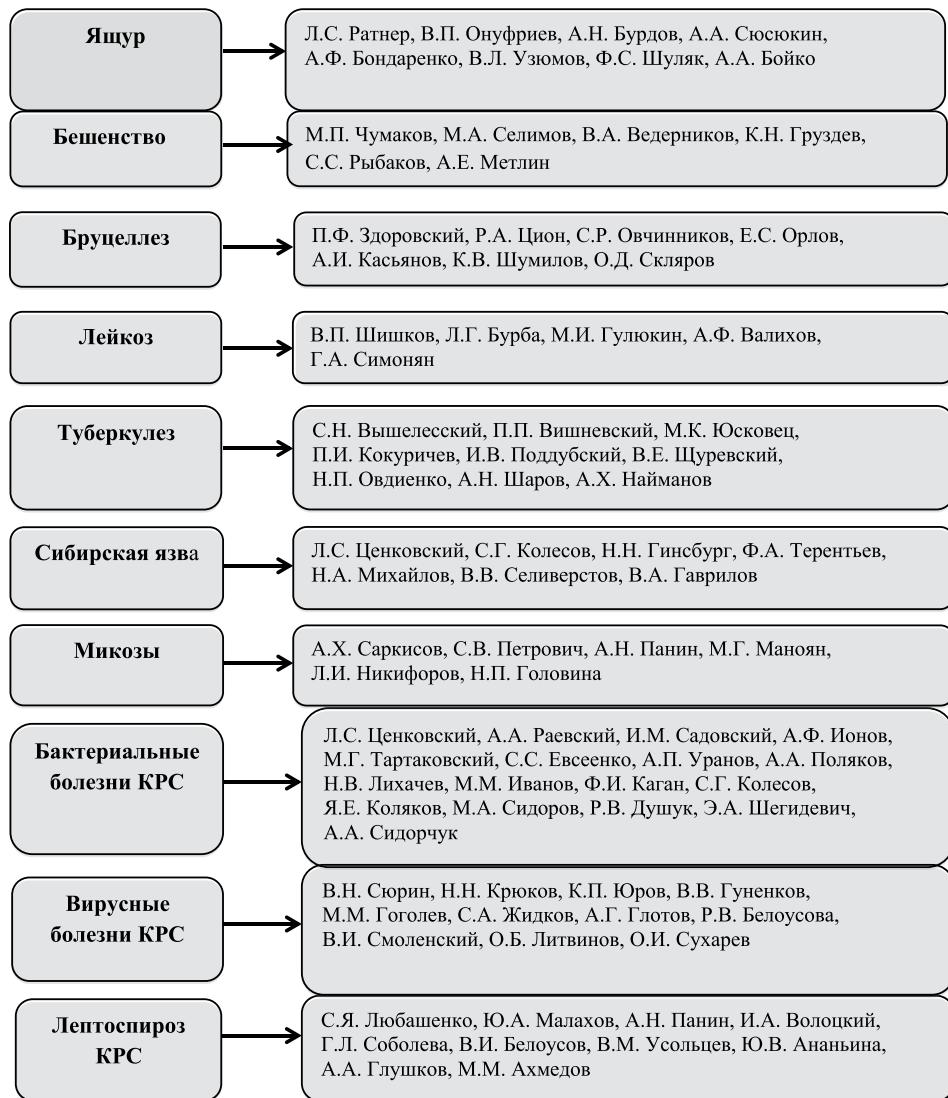
Его руководство «Частная эпизоотология» (1935 г.) и «Общая эпизоотология» его ученика Н.С. Ганнушкина не на одно десятилетие стали классическими, настольными книгами ветеринарных

специалистов. Дело и творчество академика С.Н. Вышеселесского достойно продолжили его ученики Н.В. Лихачев, Я.Р. Коваленко, В.Н. Сюрин, И.А. Бакулов, каждый из которых в последующем руководил институтом и создал свою школу. Невозможно и бессмысленно здесь перечислять всех значимых ветеринарных инфекционистов — вот лишь некоторые школы и имена.

Необходимо подчеркнуть, что созданные в середине прошлого столетия школы отечественных ученых сохранены и продолжают успешно существовать в новых условиях, несмотря на ряд совершенно драматических периодов.

Период старта нашей компании по времени совпал с возрождением отрасли отечественного животноводства, когда чрезвычайную актуальность

#### **Ведущие ученые в борьбе с особо опасными и распространенными инфекциями крупного рогатого скота**



приобрели массовые инфекционные заболевания, сопровождающиеся поражением желудочно-кишечного и респираторного тракта, а также органов репродукции. Как правило, вспышки подобного рода заболеваний носили полиэтиологическую природу и протекали по типу смешанных заболеваний. Практика требовала новые вакцины препараты. Таким образом, в ответ на новые вызовы был дан старт разработки вакцин серии КОМБОВАК.

Наша работа по созданию комплексной вакцины КОМБОВАК стартовала в начале 90-х, сразу после образования компании «НАРВАК». Научное руководство осуществили наши учителя, профессора В.А. Сергеев и Б.Г. Орлянкин. Примечательно, что среди исполнителей оказались ученики многих известных ученых — М. Корицкая, М. Демкина, И. Непоклонова (школа академика В.Н. Сюрина), М. Мусиен-

ко (школа профессора Л.П. Дьяконова), О.А. Верховский, А.Д. Забережный (школа академика Г.Ф. Коромыслова).

В настоящее время в РФ зарегистрированы 82 отечественные вакцины для КРС, внедренные в ветеринарную практику в XX–XXI вв. (табл. 5).

Следует сказать, что нами (компания «НАРВАК»/«Ветбиохим») разработаны и успешно внедрены в ветеринарную практику 6 комплексных препаратов, которые перекрывают спектр из 14 серьезных вирусных и бактериальных болезней КРС.

Более подробно информация об этих разработках представлена в соответствующих разделах данного Руководства.

Необходимо подчеркнуть, что научный поиск и новые разработки препаратов для КРС активно продолжаются и практика вправе ожидать от нас новых более мощных и эффективных инструментов.

**Таблица 5. Иммунобиологические лекарственные средства для крупного рогатого скота, зарегистрированные в РФ**

Вакцины			
98			
бактериальные	вирусные	грибные	комбинированные
<b>45</b>	<b>39</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
отечественные			зарубежные
<b>82</b>		<b>16</b>	
ФГБУ «ВНИИЗЖ»	<b>16</b>	Laboratorios Hipra, S.A.	<b>6</b>
ФКП «Армавирская биофабрика»	<b>14</b>	Zoetis LLC	<b>6</b>
ФКП «Ставропольская биофабрика»	<b>11</b>	Merial, Inc.	<b>1</b>
ФКП «Щелковский биокомбинат»	<b>9</b>	Intervet International B.V.	<b>1</b>
ООО «АГРОВЕТ»	<b>7</b>	Ceva Sante Animale	<b>1</b>
ФГБНУ ФЦЦВиМ	<b>7</b>	Burgwedel Biotech GmbH	<b>1</b>
ООО «Ветбиохим»	<b>6</b>		
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»	<b>4</b>		
ФКП «Орловская биофабрика»	<b>3</b>		
ОАО «Покровский завод биопрепаратов»	<b>3</b>		
ФКП «Курская биофабрика» — Фирма «БИОК»	<b>1</b>		
ООО «Аптека-Сервис»	<b>1</b>		
Против инфекций ЖКТ		Против инфекций респираторного тракта (РТ)	Против инфекций ЖКТ и РТ
отеч.	заруб.	отеч.	заруб.
<b>10</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>3</b>
Против других инфекций			
отеч.	заруб.		
<b>57</b>	<b>3</b>		

### 6.3. «НАРВАК»—«Ветбиохим»: традиции, настоящее, будущее

На рубеже столетий, около 30 лет назад была создана одна из первых отечественных негосударственных биотехнологических компаний — «НАРВАК», которая впоследствии была преобразована в компанию «Ветбиохим». Главной миссией компании является разработка, внедрение и производство эффективных биологических препаратов для профилактики и лечения инфекционных болезней животных.

С гордостью и величайшим почтением мы чтим память наших замечательных учителей: академиков Сюрина В.Н., Мозгова И.Е., Бакурова И.А., профессоров Хрусталевой И.В., Шарабрина И.Г. Мы глубоко убеждены, что они, в свою очередь, являются прямыми продолжателями научного наследия своих великих предшественников. Нашиими научными наставниками стали сильнейшие профессионалы вакцинного дела — профессора Сергеев В.А. и Орлянкин Б.Г.



Рис. 33. С учителями и наставниками  
В.А. Сергеевым и Б.Г. Орлянкиным

Несомненная заслуга Виталия Александровича, что он привил нам главные правила исследователя, сформулированные гениальным Фараадеем: *To work, to write, to publish!* Его лучший ученик Борис Григорьевич Орлянкин привнес

в наши разработки выверенный методический подход, глубокое изучение каждого объекта исследований и прекрасный опыт вирусолога, усилиями которого в России впервые были выделены многие возбудители вирусных болезней.



Рис. 34. Академик М.П. Чумаков  
(1909–1993)



Рис. 35. Академик В.М. Жданов  
(1914–1987)

Именно наши учителя ввели нас в мир медицинской вирусологии: состоялось знакомство с легендарными академиками М.П. Чумаковым и В.М. Ждановым, возглавлявшими в то время ведущие вирусологические центры мира (Институт полиомиелита и Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского), и был открыт

доступ к наиболее прогрессивной научно-методологической базе, которой располагали эти центры.

Это было замечательное время (1984–1991 гг.), когда наша научная деятельность формировалась в стенах знаменитого ветеринарного центра ВИЭВ, известного своими замечательными школами и традициями. С большим почтением мы вспоминаем имена замечательных ученых: академиков Саркисова А.Х. и Коромыслова Г.Ф., профессоров и научных сотрудников Бурбу Л.Г., Шуревского В.Е., Шегидевича Э.А., Дьяконова Л.П., Юррова К.П., Гоголева М.М., Караваева Ю.Д., Филиппова В.В., Кузяева А.Н. и многих других. Именно ВИЭВу мы обязаны той школой, которая сформировала основу нашего коллектива: Б.Г. Орлянкин, А.Д. Забережный, О.А. Верховский, М.И. Мусиенко, В.И. Кис, Е.С. Федорова. На стадии рождения компании команда была усиlena прекрасными специалистами в области биохимии, молекулярной и клеточной биотехнологии, представителями научной школы биофака МГУ — С.Л. Кальнин, В.В. Цибезов, Т.В. Гребенникова, В.В. Грабовецкий, А.В. Кривонос. Помимо этого, успешно дополнили коллектив А.П. Котельников и А.М. Мишин — представители Покровской школы, Г.Л. Соболева — из ВГНКИ ветпрепараторов, а также талантливые воспитанники академика В.Н. Сюрина — М.М. Демкина, М.А. Корицкая, В.И. Кис. Таким образом, была сформирована команда единомышленников, призванная разработать и внедрить такие биопрепараты для отечественного животноводства, способных конкурировать с продукцией иностранных компаний, которые на тот момент доминировали на российском рынке.

Практически с момента своего создания в марте 1992 года научно-производственное объединение «НАРВАК»

базируется в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Первоначальное сотрудничество еще в середине 80-х годов по изучению энтеропатогенных вирусов животных и человека послужило основой для взаимного доверия и плодотворного долголетнего научного сотрудничества. Нельзя в этом контексте не остановиться на личности академика Д.К. Львова. Выпускник Ленинградской военно-медицинской академии, ученик академика Е.Н. Павловского, всемирно известный вирусолог, эрудит, организатор многочисленных экспедиций, продолжающих традиции «охотников за микробами», Дмитрий Константинович стал нашим новым наставником. Главное, он никогда не делал различий между вирусами животных и человека, что позволило нам войти в совершенно иной мир — мир большой науки. Непросто далось Дмитрию Константиновичу решение о введении в структуру института нового отдела — прикладной вирусологии и иммунологии, в который вошли наши лучшие специалисты.

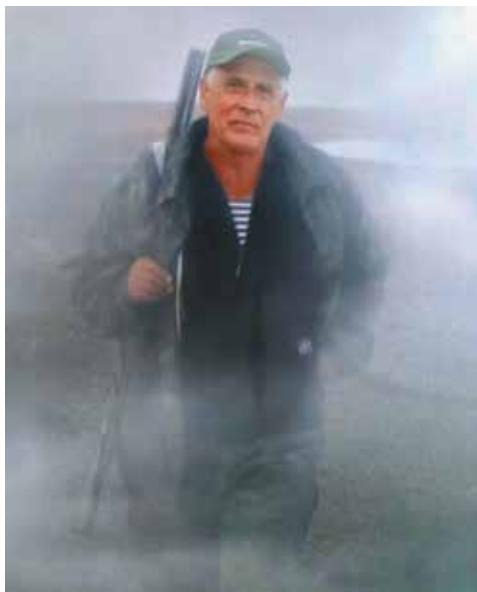


Рис 36. Д.К. Львов в одной из экспедиций по изучению эпидемиологии гриппа

За эти годы знакомство и научное сотрудничество с такими корифеями, как член-корреспондент РАН Л.В. Урываев, профессора С.С. Ямникова, Я.Я. Цилинский, Р.А. Гибадулин, Я.М. Селиванов, С.В. Грибенча, И.Ф. Баринский, академики РАН Н.В. Каверин, С.М. Клименко и другие значительно расширило наш кругозор в области таких заболеваний, как бешенство, хламидиоз, ротавирусная болезнь, грипп и др. В стенах прославленного Института вирусологии им. Д.И. Ивановского были защищены наши докторские диссертации и выросло новое поколение наших учеников. Мы чрезвычайно гордимся тем, что коллективу наших сотрудников было поручено написать разделы по вирусным болезням животных в «Руководстве по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных» под редакцией академика РАН Д.К. Львова, вышедшем в конце 2013 года. И по сей день отдел продолжает успешно функционировать уже в рамках объединенного «Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи».

На протяжении всей истории компании нас связывали тесные творческие контакты с МВА (нашей *alma mater*), ВГНКИ ветпрепаратов, ВНИИЗЖ, ВИЭВ.



Рис. 37–38. В родной *alma mater*

Огромное впечатление на нас произвело посещение крупнейших западных биоиндустриальных компаний — «Мериал», «Пфайзер», «Форт-Додж», «Интервет», «Байер», «Берингер» и т.п. В этом контексте необходимо вспомнить нашего куратора и большого друга Алексея Константиновича Чулкова, который, будучи советником министра сельского хозяйства РФ, с присущей ему энергетикой помогал в организации этих командировок. Особенно ярко врезалась в память первая поездка в Лион, на завод компании «Рон-Мерьё». Посещение производственных цехов, лабораторий, участие в великолепных семинарах и цикл лек-

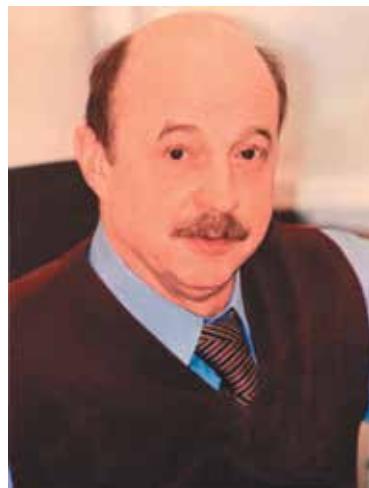


Рис. 39. А.К. Чулков (1957–2007)

ций, прочитанных лучшими научными и техническими экспертами, значительно расширили горизонты нашего научного мировоззрения. А как можно забыть знакомство с президентом компании доктором Шарлем Мерьё, сыном основателя компании Марселя Мерьё, одного из лучших учеников великого Пастера. Вот она, связь времен!

Начиная с 2009 года компания НПО «НАРВАК» была преобразована, и сейчас вся работа по разработке и внедрению препаратов проводится компанией «Ветбиохим» в сотрудничестве с АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных». Компания к настоящему моменту входит в ТОП-5 негосударственных ветеринарных компаний и располагает уникальным сплоченным коллективом из лучших специалистов отрасли. Сегодня в нашем коллективе трудятся 10 докторов наук, 39 кандидатов наук, более 50 дипломированных специалистов.

Таким образом, в достаточно непростой период была воплощена прогрессивная идея соединения в одной структуре научно-исследовательского и производст-

венного биотехнологического подразделений, позволивших взаимодополнять друг друга и эффективно воздействовать на процессы НИР и ускоренного внедрения их результатов в случае необходимости в производство, чего так не доставало институтам и биофабрикам советского периода.

Наше участие и успешная реализация по меньшей мере 10 крупных международных проектов позволили выйти на принципиально иной уровень научных исследований и биотехнологических приемов при разработке и производстве лекарственных средств для животных. Возникло творческое содружество с выдающимися профессорами современности — Диком Виттером, Биллом Менгелингом, Дэвидом Свейном, Флоранс Клике, Альбертом Остерхаузом и другими. Эти потрясающие профессионалы, на статьях и книгах которых мы были воспитаны, стали нашими собеседниками, а порой даже соавторами и друзьями. Особо в этом контексте хочется отметить две ведущих научно-исследовательские школы США — университет Огайо и NADC в Эймсе, Айова.

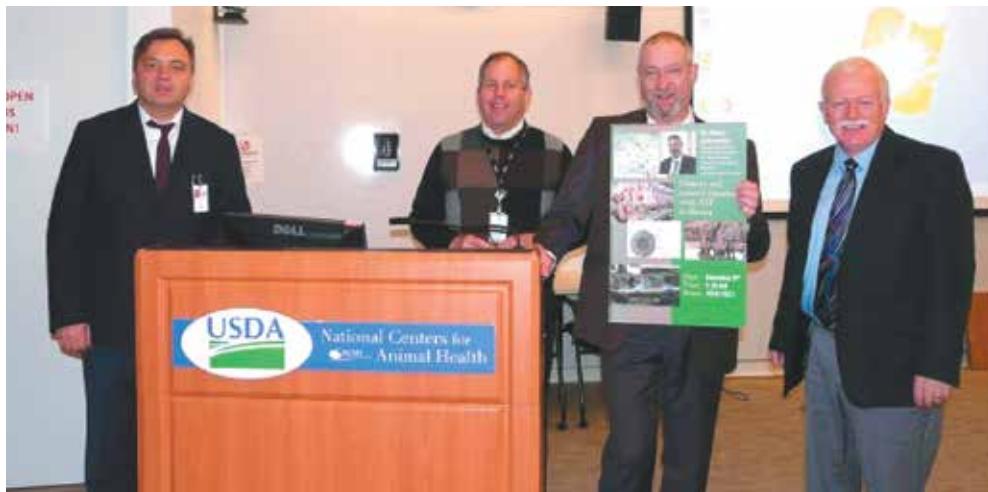


Рис. 40. Посещение NADC — Национального центра по изучению болезней животных (с профессорами К. Лагером и М. Керли). Эймс, Айова, США



Рис. 41–46. Производственная площадка «Ветбioxим»

Основными принципами стратегии иммунопрофилактики инфекционных болезней животных, на которых построен базис в нашей компании, являются:

- ограниченное использование живых вакцин,
- развитие направления использования маркированных и рекомбинантных вакцин,
- разработка рациональных схем иммунопрофилактики на основе данных лабораторной диагностики,
- постоянное усовершенствование биопрепараторов (адьюванты, спектр штаммов, защитные среды и т.д.).

В настоящее время основная стратегия развития компании «Ветбioxим» направлена на запуск в действие новой современной площадки по производству биологических препаратов, отвечающей самым строгим параметрам современной надлежащей производственной практики (GMP). Эта платформа реализуется в фармацевтическом кластере «ТЕХНОПОЛИС», г. Москва.

Новые производственные мощности — на площади свыше 6000 м<sup>2</sup> — спроектированы и построены с учетом правил GMP и предусматривают использование современных технологий. Предприятие

оснащено великолепным современным оборудованием на всех этапах производства: от участка водоподготовки до фасовки и упаковки готовой продукции.

Стремительный прогресс биологической науки в целом и вакцинологии в частности в сочетании с развитием современных биотехнологий существенно меняют и облик фармпредприятий. Уже никого не удивишь вакцинами, разработанными с использованием подходов обратной генетики и рекомбинантных технологий. Великолепной иллюстрацией этого может служить моментальный ответ науки на вызов, связанный с пандемией COVID-19, когда в течение полугода были разработаны сразу несколько вариантов вакцинных препаратов.

На наших глазах происходят грандиозные перемены как в обществе, так и в развитии животноводства. Вместе с тем неизменным остается заложенный нашими учителями подход в борьбе с инфекционными болезнями: глубокое изучение природы этиологических агентов заболеваний, всестороннее познание особенности их пато- и иммуногенеза и на этой основе — конструирование высокоэффективных профилактических препаратов для предотвращения этих заболеваний.

В результате уникальной синергии лучшего отечественного и международного опыта почти за 30 лет сформировалась современная биотехнологическая компания, ориентированная на дальнейшее развитие.

Как следует из представленного выше материала, за время существования компании нами был аккумулирован определенный опыт в деле, которому мы посвятили свою жизнь, — прикладной иммунологии. За эти годы разработаны и внедрены в ветеринарную практику 10 вакцин и более 21 диагностических наборов для крупного рогатого скота.

Наши научные сотрудники и консультанты регулярно выступают с докладами на внутрироссийских и международных форумах (более 50 выступлений), участвуют в международных научных проектах, организуют выездные семинары, научные сессии, коллоквиумы и конгрессы (в том числе международные) как для практических работников животноводческих предприятий, так и для ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы (диагностические лаборатории различного уровня и подчиненности), производителей лекарственных средств для ветеринарного применения, ученых, аспирантов и студентов российских НИИ и вузов.

Мы выражаем слова огромной благодарности нашим коллегам, лучшим экспертам нашей страны — академикам Гулюкину М.И., Панину А.Н., а также профессорам и научным сотрудникам — Гулюкину А.М., Шабейкину А.А., Власовой Н.Н., Буковой Н.К., Маноян М.Г., Склярову О.Д., Найманову А.Х., Глотову А.Г., Глотовой Т.И., Севастьяновой Т.В. за представленный высокопрофессиональный материал по отдельным главам этой книги.

Наши международные связи с учеными крупнейших научных ветеринарных центров Европы, Азии и Америки позволяют использовать мировой научный опыт в создании новых препаратов и диагностикумов для собственного производства и привлекать наших зарубежных коллег в качестве эксклюзивных докладчиков на регулярно проходящем в России Международном ветеринарном конгрессе, организуемом под эгидой Национальной ветеринарной ассоциации и Минсельхоза РФ. С большим удовольствием мы презентуем в этой книге статьи наших знаменитых зарубежных коллег — академика Линды Сайф, профессора Анастасии Власовой.



Рис. 47–49. С отечественными и зарубежными коллегами на форумах и конгрессах

В монографии рассмотрены не только классические схемы, описывающие наиболее распространенные и экономически значимые инфекционные болезни крупного рогатого скота, но также средства борьбы с ними и методы диагностики. Большая часть приведенных данных основана на анализе самых последних достижений мировой науки и практики и на результатах собственных исследований авторов.

Особое значение в книге мы постарались уделить современным представлениям об особенностях организации и функционирования иммунной системы КРС как единого чрезвычайно сложно устроенного механизма. На наш взгляд, это ключ к расшифровке иммунного ответа и грамотному подходу к разработке средств профилактики инфекционных заболеваний.

Монография ни в коей мере не претендует на уровень энциклопедического издания; в ней собраны данные по самым актуальным, на наш взгляд, и наиболее значимым инфекционным болезням крупного рогатого скота. Вместе с тем надеемся, что настоящее руководство найдет свою аудиторию среди студентов, научных и практических специалистов. Любые критические замечания и позитивные отзывы будут приняты нами с благодарностью.

## II. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗДОРОВЬЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД

*Власова А.Н., Сайф Л.*

### **Содержание**

Краткая аннотация
Введение
Врожденный иммунитет
Адаптивные механизмы иммунитета
Иммунная система слизистых оболочек
Системный иммунитет
Патогены, ассоциированные с иммунопатологией
Функционирование иммунитета во время стельности и отела
Иммунные механизмы в молочной железе
Защита новорожденных телят за счет пассивного иммунитета
Иммунная система и микробиом
Иммунная система и питание
Ныне доступные вакцины и их эффективность
Антимикробная и вспомогательная терапия для КРС
Заключительные замечания
Библиография

### **Краткая аннотация**

С ростом мирового населения (7,8 млрд) возрастает и нагрузка на мясное и молочное животноводство. Интенсификация и расширение этой отрасли неизбежно ведет к повышению рисков распространения инфекционных заболеваний и усугубления ситуации по ним. Отсюда можно заключить, что углубленное понимание функционирования механизмов иммунитета необходимо нам для того, чтобы получить оптимальные инструменты для борьбы с существующими и потенциальными патогенами и тем самым повысить уро-

вень продовольственной безопасности. Несмотря на то, что мясное и молочное животноводство несомненно является наиболее важной отраслью сельского хозяйства, существует крайне мало обзоров, дающих целостную картину работы механизмов иммунитета у крупного рогатого скота. В настоящем тексте мы задаемся целью заполнить эту информационную лакуну и предложить современный обзор имеющихся знаний об иммунной системе крупного рогатого скота, отдельно выделив нерешенные вопросы и наиболее важные задачи, стоящие перед исследователями данной проблематики. Мы также остановимся на том, как комбинация доступных в настоящее время профилактических и терапевтических стратегий, а также принципов содержания животных может позволить поддерживать здоровье поголовья на оптимальном уровне в сухостойный период (1,5–2 месяца до отела) у молочных коров и среди новорожденных телят.

### **Введение**

Смертность плодов и новорожденных телят является серьезным фактором, вносящим вклад в возрастание производственных затрат. Кроме того, в переходный период (приблизительно за три недели до и через три недели после отела) у молочных коров имеет место нарушение регуляции иммунных и метаболических механизмов, в связи с чем они становятся уязвимы для различных инфекционных и неинфекционных заболеваний. Несмотря на повсеместную

доступность вакцин и антимикробных соединений, ряд инфекционных заболеваний по-прежнему характеризуется высокой заболеваемостью и смертностью, приводящими к экономическим потерям в секторе мясного и молочного животноводства. Чтобы поддерживать оптимальное состояние здоровья в поголовье крупного рогатого скота, крайне важно понимать принципы работы естественных механизмов иммунной защиты, а также понимать, как вакцинация, меры биобезопасности, питание, условия содержания животных и уход за телятами могут помочь поддерживать работу этих защитных механизмов и повысить уровень защиты, обеспечиваемой механизмами иммунитета. Появление новых эффективных технологий секвенирования и публикация полной последовательности генома КРС в 2009 году позволили нам в значительной степени продвинуться в познании работы иммунных механизмов у крупного рогатого скота. Новые знания активно используются для генетической селекции животных с желательными показателями продуктивности и здоровья, однако методов генетического снижения восприимчивости к инфекционным заболеваниям пока не существует (Meade, 2015).

Двумя наиболее серьезными проблемами в мировом мясном и молочном животноводстве являются микоплазмоз и инфекции молочных желез (мастит), обходящиеся отрасли в 35 млрд долларов ежегодно (Site, Schiller, Oesch et al., 2010). Респираторные заболевания чаще всего ассоциированы с участием нескольких патогенов одновременно, поэтому о них говорят как о комплексе респираторных заболеваний крупного рогатого скота (McGill and Sacco, 2020). Они являются основной причиной финансовых потерь в мясном и молочном животноводстве на

территории Северной Америки. С комплексом респираторных заболеваний КРС ассоциирован ряд бактериальных и вирусных патогенов (см. табл. 1), а также ряд факторов стресса, среди которых жара, холод, обезвоживание или проблемы с подбором рациона, травмы или контаминация пылью (Saif, 2010; McGill and Sacco, 2020). Сходным образом был идентифицирован ряд бактерий и вирусов, вызывающих у молодняка и взрослых животных заболевания желудочно-кишечного тракта (табл. 1). Наиболее значимые патогены, вызывающие диарею, — это коронавирус, ротавирус и вирус диареи КРС, *Salmonella spp.* (несколько серотипов: Dublin, Heidelberg и Newport), *Escherichia coli* K99, криптоспоридии и *Clostridium perfringens* (табл. 1) (Fulton, Herd et al., 2015; Smith, 2015; Holschbach and Peek, 2018). В свете того, что большинство вакцин против энтеропатогенов низкоэффективны или не обеспечивают защиты широкого спектра, а также в связи с внедрением стратегий ответственного использования антибиотиков для снижения рисков возникновения антибиотикорезистентных организмов, поддержание здоровья в поголовье КРС может стать очень трудновыполнимой задачей.

Среди других значимых для отрасли патогенов КРС — вирус ящура, один из наиболее широко распространенных патогенов, которым может заражаться в том числе человек (Toka and Golde, 2013), вирус лейкемии крупного рогатого скота, а также возбудители паратуберкулеза, криптоспоридиоза, лептоспироза и бруцеллеза (Tomley and Shirley, 2009; Ohira, Nakahara et al., 2016; Konnai, Murata et al., 2017). Помимо ущерба отрасли, заметное число бактериальных (возбудители лептоспироза, бруцеллеза) и некоторые вирусные (коронавирус, ротавирус)

**Таблица 1. Вирусные и бактериальные патогены, ассоциированные с комплексом респираторных заболеваний КРС, энтеритами или симптоматикой обоих типов**

Вирусы	Бактерии
<b>Комплекс респираторных заболеваний</b>	
Вирус парагриппа типа 3	<i>Mannheimia haemolytica, M. haemolytica</i>
Респираторно-синцитиальный вирус	<i>Pasteurella multocida, P. multocida</i>
Аденовирус	<i>Histophilus somni, H. somni</i>
Энтеровирус	<i>Mycoplasma bovis, M. bovis</i>
Реовирус	<i>Trueperella pyogenes, T. pyogenes</i>
Вирус гриппа D	
<b>Энтериты</b>	
Ротавирус	<i>Salmonella enterica, S. enterica</i>
Торовирус	<i>Mycobacterium avium, M. avium</i>
Калицивирус (небовирус)	<i>Cryptosporidium parvum, C. parvum</i>
	<i>Clostridium perfringens, C. perfringens</i>
	<i>Escherichia coli, E. coli</i>
<b>Симптомы обоих типов</b>	
Вирус диареи	
Коронавирус	
Герпесвирусы 1 и 4	

патогены могут становиться также причиной зоонозов, вызывая различные по своей природе заболевания у человека, подчас в тяжелой форме (McDaniel, Cardwell et al., 2014).

Таким образом, защита здоровья крупного рогатого скота крайне важна как для национальной и всемирной безопасности, так и для благополучия населения. А для этого требуется углубленное и комплексное понимание функционирования иммунной системы этих экономически важных сельскохозяйственных животных, о чем и пойдет речь в настоящем обзоре.

## **Врожденный иммунитет**

В последние десятилетия в фокусе внимания находился приобретенный иммунитет как основной обеспечивающий защиту животных от атаки па-

тогенов. Однако новые научные данные указывают на то, что врожденные механизмы иммунитета у КРС намного сложнее устроены, чем прежде казалось, и играют важную роль в формировании адаптивного иммунитета, а также формировании и поддержании иммунитета к инфекционным заболеваниям и постvakцинальному иммунитету. К сожалению, наши знания в этой области в настоящее время в значительной степени фрагментарны и многое требует уточнений.

У КРС, как и у многих других животных, первым рубежом защиты являются физические барьеры и механизмы таких структур, как кожа и слизистые оболочки, а также элиминация вторгающихся извне микроорганизмов за счет таких явлений, как кашель, чихание, рвота и понос. Клетки эпителия — помимо создания механических

барьеров в дыхательном, пищеварительном и урогенитальном трактах — секретируют ряд антимикробных факторов, таких как антимикробные пептиды и дефензины, и таким образом вносят свой вклад в работу механизмов врожденного иммунитета. Другие жизненно важные элементы системы врожденного иммунитета имеют клеточную природу: это нейтрофилы, естественные киллеры (NK-клетки), дендритные клетки, гамма-дельта-Т-клетки ( $\gamma\delta$ T), инвариантные Т-клетки, связанные со слизистыми оболочками, макрофаги и гранулоциты (см. табл. 2). Несмотря на то, что наши знания о дифференцировке и работе этих клеток большей частью основываются на экспериментальных данных, полученных для мышей и людей, имеются и данные для КРС, полученные в ходе исследований мастита, туберкулеза, вирусной диареи, ящура, герпесвирусной и респираторно-синцитиальной инфекции (Ackermann, Derscheid et al., 2010; Levings and Roth, 2013; Toka and Golde, 2013; Ferluga, Yasmin et al., 2020). Притом только у КРС новорожденные телята демонстрируют необычайно высокий уровень  $\gamma\delta$ T-клеток (до 60% общего пула лимфоцитов), и известно, что  $\gamma\delta$ T-клетки жвачных экспрессируют антиген WC-1, чья функция пока не установлена, но который, возможно, играет роль в распознавании паттернов микробных агентов/патогенов (Ackermann, Derscheid et al., 2010). Это может объясняться компенсацией незрелости популяций нейтрофилов, макрофагов и дендритных клеток у новорожденных телят (Chase, Hurley et al., 2008). За исключением NK-клеток, у КРС до настоящего момента не было подтверждено присутствие другой важной группы иммунных клеток — врожденных лимфоидных клеток (Toka and Golde, 2013).

Клетки всех этих разнообразных линий снабжены паттерн-распознающими рецепторами, которые взаимодействуют с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами на начальных стадиях иммунного ответа (Ackermann, Derscheid et al., 2010). Среди паттерн-распознающих рецепторов лучше всего описаны toll-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs). Для иммунных клеток КРС подтверждено наличие десяти типов TLRs, обладающих различным и иногда взаимно-перекрывающимся сродством к ряду патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (Novak, 2014). Так, TLR1 распознает триацил-липопептиды микобактерий; TLR2 — пептидогликаны грамположительных организмов, липоарабиноманнан микобактерий и зиносан грибов; TLR3 — двуцепочечную РНК; TLR4 — липополисахариды; TLR5 — флагеллин; TLR6 — диацил-липопептиды микоплазм; TLR7 и 8 — одноцепочечную РНК; TLR9 — неметилированные CpG-мотивы в последовательностях ДНК; функция и сродство TLR10 в настоящее время полностью не изучены (Novak, 2014). Некоторые TLRs (1, 2, 5–9) передают сигнал по MyD88-зависимому пути, в ходе чего активируется транскрипционный фактор NF-каппа Б и запускаются воспалительные процессы. TLR3, напротив, является MyD88-независимым и передает сигнал по пути TRIF/TRAФ, индуцируя выработку интерферон-регулирующих факторов (IRF) 3 и 7, а также интерферона типа I. Для TLR4 была показана способность активировать оба сигнальных пути, MyD88 и TRIF/TRAФ, в зависимости от стимула. Прежде чем связаться с TLR4, липополисахариды, присутствующие в клеточных стенках таких бактерий, как *H. somni*, *M. haemolytica* и *P. multocida*, взаимодействуют с липополисахарид-

**Таблица 2. Клетки, принимающие участие в работе механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, идентифицированные у КРС, и их основные функции**

Тип клеток	Функции
<b>Врожденный иммунитет</b>	
Эпителиальные клетки	Сенсибилизация антигенами, выполнение функций врожденного иммунитета, таких как выработка цитокинов (в том числе интерферонов типов I и III), рекрутинг (вовлечение) клеток иммунной системы, участвующих в процессе воспаления, запуск механизмов адаптивного иммунного ответа
Эндотелиальные клетки	Модуляция антиген-представляющей функции, эффекторные иммунные функции, регуляция миграции лейкоцитов между кровотоком, интерстициальной тканью и лимфатическими компартментами в ходе поддержания гомеостаза или воспаления
Дендритные клетки	Представление антигенов. Фагоцитоз бактериальных и зараженных вирусами клеток. Масштабная выработка интерферонов типа I, секреция цитокинов (интерлейкина 1 (IL-1), IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18), активирующих NK-клетки. Взаимодействие с другими иммунными клетками
Нейтрофилы	Поглощение микробов, инородных веществ, высвобождение содержимого гранул и внеклеточных нейтрофильных ловушек, состоящих из ДНК, гистонов и антимикробных пептидов (альфа-дефензинов), осуществляющих захват микробов
NK-клетки	После активации интерферонами I типа выбрасывают перфорин, убивают зараженные вирусом клетки и вырабатывают интерферон гамма
Макрофаги	После активации Th1/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ (классическая активация) фагоцитоз бактериальных и зараженных вирусами клеток. Альтернативная активация Th2/IL-4 (аллергическая) или IL-10 (регуляторная) у КРС мало изучены. Представление антигенов
Моноциты	Представление антигенов, фагоцитоз погибших или умирающих клеток, уничтожение внеклеточных патогенов, выработка провоспалительных цитокинов
$\gamma\delta$ Т-клетки	После активации, независимой от молекулярного комплекса гистосовместимости, — выработка ряда цитокинов/хемокинов (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, RANTES, IP-10, лимфотактина), лизис зараженных или трансформированных клеток, взаимодействие с другими иммунными клетками, контроль созревания дендритных клеток. Также могут играть роль антиген-представляющих клеток
Инвариантные Т-клетки, связанные со слизистыми оболочками	Выработка интерферона гамма, отчего возможна индукция провоспалительного фактора некроза опухоли $\alpha$ , активных форм кислорода и нитрозил-радикала
Клетки В1-B	Выработка естественных антител
<b>Адаптивный иммунитет</b>	
$\alpha\beta$ Т-клетки [Т-киллеры, Т-хелперы (Th1, Th2, Th17, Treg)]	Выработка цитокинов, регулирующих работу механизмов адаптивного иммунитета. Участие в процессе переключения изотипов. Лизис поврежденных клеток собственного организма. Выработка цитокинов, способных угнетать функционирование лейкоцитов
В-клетки	Зрелые В-клетки отвечают за представление антигенов. К ним также относятся специфичные к отдельным антигенам клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки. Плазматические клетки в свою очередь синтезируют и секретируют антитела, специфичные к конкретным антигенам

связывающим белком, растворимым CD14, а также кофактором TLR4 — MD2. TLR4 также распознает и связывает F-белок респираторно-синцитиального вируса. Помимо TLR3, 7–9, вирусы герпеса 1, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус и вирус диареи КРС распознаются и связываются с внутриклеточными рецепторами, распознающими вирусные паттерны, такими как RIG-I-подобные рецепторы (индуцируемый ретиноевой кислотой ген-I) и рецептор MDA-5 (ген, ассоциированный с дифференцировкой меланом 5). Результатом этих взаимодействий становится TLR-независимая активация транскрипционного фактора NF-каппа би и интерферон-регулирующих факторов 3 и 7, опосредованная митохондриальным антивирусным сигнальным белком (MAVS), также известным как стимуляторный промотор интерферона бета, вирус-индуцирующий сигнальный белок (VISA) или Cardif (Ackermann, Derscheid et al., 2010).

После активации местных эффекторных клеток (эндотелиальные и эпителиальные клетки, макрофаги и дендритные клетки) системы врожденного иммунитета провоспалительными цитокинами (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли, интерлейкин-6) индуцируют эти эффекторные клетки вырабатывать ряд цитокинов и хемокинов, стимулирующих миграцию нейтрофилов и моноцитов в ткани, находящиеся под угрозой. Те в свою очередь запускают сигнальные пути, обеспечивающие рекрутинг дендритных клеток, NK-клеток, Т- и В-лимфоцитов. Интерлейкины 4, 10 и 17 со своей стороны активно способствуют реализации каскада воспалительных реакций (Bannerman, 2009).

К провоспалительным хемокинам относятся интерлейкин-8 (CXCL8),

GCP-2 (CXCL6), ENA-78 (CXCL5), Gro (CXCL1-3), IP-10 (CXCL10), I-Tac (CXCL11), RANTES (CCL5), MIP-alpha (CCL3) и -beta (CCL4), MCP 1-5 (CCL7, 8, 12, 13) и эотаксины 1-3 (CCL24, 26) — выработка этих факторов зависит от того, какие рецепторы были простимулированы: среди таких рецепторов CXCR1, 2 и 3 и CCR1, 2, 3 и 5. Лимфоциты, для которых характерен хоминг в ткани слизистых оболочек, используют другой набор хемокинов (так, наивные клетки памяти — CCR1-10 и CSCR1-3, а клетки памяти — CCR8-10, CSCR1, 2, 4 и 5). Хемерин выступает как хемотактический фактор для дендритных клеток и макрофагов. Сигнальные пути, запускающиеся при распознавании вирусов, задействуют интерферон-регулирующие факторы 3 и 7, что приводит к индукции выработки и высвобождения интерферонов типа I ( $\alpha$  и  $\beta$ ) иммунными клетками различных типов. Эти интерфероны связываются с рецепторами Jak/Stat близлежащих клеток, и через дальнейший каскад сигналов угнетается эукариотический фактор инициации трансляции 2 альфа (EIF2 alpha) для снижения уровня репликации вирусного генома.

Другим важным классом иммунологически активных молекул, регулирующих развитие, масштабы, продолжительность и реализацию воспалительных реакций, являются оксилипиды, ведущие происхождение от внутриклеточных липидов. Оксилипиды синтезируются из полиненасыщенных жирных кислот омега-6, линолевой и арахидоновой, и омега-3, экозапентаеновой (EPA) и докозагексаеновой (DHA) (Raphael and Sordillo, 2013). Данные субстраты окисляются неэнзиматически за счет активных форм кислорода или энзиматически при помощи циклооксигеназ, липок-

сигеназ и цитохрома Р450, в ходе чего образуется ряд оксилипидов, таких как простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и липоксины (Sordillo and Raphael, 2013).

Важный гуморальный элемент врожденного иммунитета представляют собой естественные антитела (NAbs). Большой частью они относятся к изотипу IgM (также среди них встречаются IgG и IgA) и синтезируются без стимуляции со стороны В1-В-клеток, играя крайне важную роль в развитии первичного иммунного ответа (Ploegaert, Tijhaar et al., 2011). Большой процент естественных антител связывается с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами с относительно низкой аффинностью. Одной из наиболее важных функций естественных антител является активация классического каскада системы комплемента.

Система комплемента также относится к врожденным защитным механизмам. В ее работе задействована группа белков (C1-C9), в неактивной форме присутствующих в сыворотке крови, которые активируются комплексами антигена с антителом (классический путь), некоторыми углеводами (лектиновый путь) или рядом поверхностей, не защищенных природными ингибиторами (альтернативный путь). Система комплемента срабатывает по классическому пути, когда активируется белок C1, а по альтернативному — при активации белка C3, после чего реализуется каскад реакций (Korhonen, Marnila et al., 2000). Заякоривание на поверхности бактериальных либо зараженных вирусами клеток фрагментов компонентов комплемента C3 и C4 приводит к их поглощению фагоцитами, обладающими рецепторами к данным опсонинам (Rainard, 2003). Помимо непосредственного антимикробного эффекта, компоненты комплемента поддержива-

вают иммуноглобулины в растворимой форме, ограничивая формирование вредоносных иммунных комплексов и осаждение иммуноглобулинов.

Таким образом, механизмы врожденного иммунитета крупного рогатого скота имеют ряд сходств с аналогичными механизмами других видов, а также обладают уникальными чертами, которые — вкупе с особенностями анатомии жвачных — обеспечивают либо их устойчивость (рубец), либо их повышенную восприимчивость к бактериальным и метаболическим заболеваниям.

## Адаптивные механизмы иммунитета

Основные клеточные линии, обеспечивающие работу механизмов адаптивного иммунитета, — это Т- и В-лимфоциты. После распознавания антигена и срабатывания сигналов, обеспечиваемых врожденным иммунитетом, В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, секретирующие специфичные к антигену антитела. Плазматические клетки КРС способны синтезировать иммуноглобулины с тяжелыми цепями по меньшей мере пяти классов (IgM, IgG, IgA, IgD и IgE), причем для них известно три класса IgG (IgG1, IgG2 и IgG3), два класса IgM (IgM1 и IgM2), а также с легкими цепями двух типов,  $\lambda$  и  $\kappa$  (Stanfield, Haakenson et al., 2018). Функции молекул IgM, IgA, IgG1 и IgG2 подробно изучены, однако IgG3 и IgD подробно не рассматривались, так как были открыты позже. В отличие от животных многих других видов, у КРС экспрессируется лишь ограниченное число сегментов генов вариабельных цепей IgG, поэтому считается, что разнообразие IgG обеспечивается за счет рекомбинации и эндогенных мутаций в последовательности CDR3 (Zhuang,

Futse et al., 2007). Кроме того, необыкновенно длинные последовательности CDR3 на уровне трехмерной структуры приводят к формированию «микр складок», позволяющих IgG КРС связываться с антигенами, которые иначе были бы недоступны (Wang, Ekert et al., 2013). Иммуноглобулины выполняют функции нейтрализующих антител, активируют систему комплемента, индуцируют фагоцитоз, опосредованный рецепторами Fc, и регулируют зависимый от антител цитотоксический эффект. У разных пород КРС могут различаться уровни иммуноглобулинов (Wilkie, 1974). Крайне важны IgG1 и IgG2, из них первый в особенно больших количествах содержится в молозиве у коров. Иммуноглобулины класса G нужны для нейтрализации вирусов и токсинов, а также для агглютинации и опсонизации бактерий. У КРС IgG1 менее мощный опсонин, чем IgG2 (Maunsell and Chase, 2019). IgM представляет собой пентамерную молекулу, необходимую для агглютинации бактерий, связывания комплемента и опсонизации; иммуноглобулины этого класса в силу своего размера чаще встречаются во внутрисосудистом пространстве. Иммуноглобулины класса A (IgA) преобладают в различных сокретах, но в сыворотке крови КРС их концентрация невелика (Wilkie, 1974). IgA необходимы для защиты от вирусов в верхних дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте.

Невзирая на то, что методы изучения клonalного состава Т-клеток широко применялись для изучения механизмов Т-клеточного ответа у человека и мышей, знаний об этом предмете для Т-клеток КРС значительно меньше (Connelley, MacHugh et al., 2008). Антиген-специфичность Т-клеток, CD4+ либо CD8+, определяется  $\alpha\beta$ -рецептором на их поверхности, который свя-

зывается с пептидами, ассоциированными с молекулами МНС классов II и I соответственно (Neefjes, Jongsma et al., 2011). Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4+, стимулируют работу механизмов клеточного иммунитета и выработку антител; некоторые из этих клеток способны также вызывать лизис соответствующим образом сенсибилизованных клеток-мишеней. Большинство экспрессирующих CD8+ Т-лимфоцитов выступает как эффекторные клетки, напрямую вызывающие лизис клеток-мишеней — они также известны как классические цитотоксические Т-лимфоциты, однако среди этих клеток есть и не стимулирующие лизиса клетки-супрессоры (Morrison, Lukacher et al., 1986; Wyckoff, 2002). Большинство разновидностей  $\alpha/\beta$  Т-клеток, известных для других видов животных, были идентифицированы и у КРС (см. табл. 2). Среди них Т-киллеры (CD8+), Т-хелперы (CD4+, Th1, Th2 и Th17) и регуляторные Т-клетки (CD4+/CD8+CD25+). Функции их были изучены в контексте протекания некоторых инфекций и развития поствакцинального иммунного ответа (Endsley, Roth et al., 2003; Nene, Svitek et al., 2012). Результаты исследований на мышах указывают на то, что Т-хелперы 1 (Th1) большей частью выступают как провоспалительные и секрецируют IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , но не IL-4 (Mosmann and Coffman, 1989). Им в противоположность Т-хелперы 2 (Th2) чаще всего синтезируют IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10, но не IFN- $\gamma$  (Mosmann and Coffman, 1989). К какой линии будут относиться Т-хелперы, Th1 или Th2, зависит от взаимной регуляции, опосредованной IFN- $\gamma$  (синтезируется клетками Th1 и подавляет дифференцировку клеток Th2), IL-4 (синтезируется клетками Th2 и стимулирует их дифференцировку), IL-10 (синтезируется клетками Th2 и подавляет дифференцировку клеток

Th1) и IL-12 (синтезируется макрофагами и В-лимфоцитами, стимулирует дифференцировку клеток Th1) (Scott, 1993). Однако недавно полученные данные говорят о том, что опосредованная цитокинами регуляция дифференцировки и активности клеток Th1/Th2 у КРС может быть несколько более сложной и отличаться от таковой у мышь (Brown, Rice-Ficht et al., 1998). Так, например, специфичные в отношении паразитов Т-хелперы КРС синтезируют IL-4 и IFN- $\gamma$ , в то время как выработка IL-2 и IL-10 наблюдается не только у клеток, синтезирующих соответственно IFN- $\gamma$  или IL-4. Кроме того, IL-4/IL-10 и IL-12 не оказывают селективного суппрессорного или стимуляторного действия на клетки, подобные Th1. Тем не менее в некоторых исследованиях было показано, что развитие и поддержание клеточного иммунного ответа, основанного на присутствии IFN- $\gamma$ , со стороны клеток коррелировало с большей степенью контроля над некоторыми инфекциями (*M. bovis*) (Welsh, Cunningham et al., 2005). Эти наблюдения требуют проведения дальнейших исследований.

Помимо критического значения для формирования гуморального иммунного ответа, некоторые исследования подчеркивают роль Т-клеток КРС в выведении патогенов (например *Cryptosporidium parvum*) в отсутствие гуморального ответа IgG (Abrahamsen, 1998). Интересно, что Т-лимфоциты, экспрессирующие CD4+ и CD8+, а также γδ Т-клетки в присутствии материнских антител у телят обнаруживались даже в отсутствие активного гуморального иммунного ответа (Endsley, Roth et al., 2003).

Таким образом, механизмы приобретенного иммунного ответа у КРС регулируются факторами как общими с другими видами, так и уникальными, и все эти факторы необходимо учитывать при разработке стратегий профилакти-

ки и лечения, специфичных для различных возрастов и типов стад.

## Иммунная система слизистых оболочек

Иммунная система слизистых оболочек играет критическую роль, так как обеспечивает первую линию защиты от более чем 90% известных патогенов и является самым крупным органом иммунной системы в организме. К слизистой оболочке относятся четыре составляющих: 1) микробиом; 2) слизистый барьер; 3) эпителиальный барьер слизистой оболочки; 4) иммунные клетки ассоциированной со слизистой оболочкой лимфоидной ткани [MALT (mucosa-associated lymphoid tissues); собственная пластинка (lamina propria, LP), пейеровы бляшки в кишечнике и диффузно присутствующие в слизистых оболочках лимфоциты] (Chase and Kaushik, 2019; Gomez, Galvao et al., 2019). Микробиом представляет собой сообщество микроорганизмов, обитающих на поверхностях слизистых оболочек, и жизненно необходим телятам для формирования иммунной системы, а также для защиты и поддержания здоровья у КРС всех возрастов (Gomez, Galvao et al., 2019). В то время как роль рубца в работе механизмов иммунитета слизистых оболочек не прояснена, установлено, что разнообразие и численность бактерий в этом отделе желудка выше, чем где-либо еще в желудочно-кишечном тракте (Malmuthuge, Li et al., 2013; Chase and Kaushik, 2019). Желчные кислоты в тонком кишечнике также представляют собой важный защитный фактор (Niemialtowski, Schollenberger et al., 2005), между тем микробиота кишечника участвует в их метаболизме. Желчные кислоты инактивируют оболочечные вирусы и некоторые энтеропатоген-

ные бактерии, однако энтерококки и *Bacteroides spp.* способны их разлагать, в то время как бактерии-комменсалы принимают участие в метаболизме жирных кислот лишь в толстом кишечнике (Niemialtowski, Schollenberger et al., 2005).

Слизистый барьер состоит из слизи и муцинов, которые секретируют бокаловидные клетки, antimикробных пептидов (АМП; дефензинов, REGIII, лактоферрицина), а также IgG и секреторных IgA (которые сюда попадают из собственной пластиинки). Эпителиальные клетки (эпителиоциты; энteroциты в кишечнике и реснитчатые эпителиоциты в дыхательном тракте) выстилают желудочно-кишечный, репродуктивный, выделительный и дыхательный тракт и экспрессируют белки, необходимые для образования плотных контактов в эпителии слизистой оболочки. Если плотные контакты нарушаются, эпителий становится проницаемым, что ведет к системному воспалению. Шире всего известен синдром «дырявого кишечника», но данный феномен может наблюдаться и в репродуктивном, и в дыхательном трактах. Помимо формирования физического барьера эпителий слизистых оболочек выполняет секреторную и всасывающую функции (в кишечнике), вносит вклад в развитие плода (в матке), осуществляет кислородный обмен и вывод инородных субстанций и патогенов (в дыхательном тракте), а также участвует в работе механизмов врожденного иммунитета. Эпителиоциты КРС экспрессируют весь набор Toll-подобных рецепторов (TLR) (1–10) (Villena, Aso et al., 2014). TLR могут экспрессироваться внутриклеточно/базолатерально или апикально, что означает различные сигнальные пути для угроз с апикальной и базолатеральной сторон (Lee, Mo et al., 2006; Stanifer,

Mukenhirn et al., 2020). В зависимости от стимулов в просвете тракта эпителиоциты могут вырабатывать провоспалительные (IL-1 $\alpha$ , IL-8 и TNF- $\alpha$ ) или регуляторные (IL-10 и TGF- $\beta$ ) цитокины (McClenahan, Sotos et al., 2005; Chase and Kaushik, 2019).

Представители микробиома стимулируют синтез эпителем слизистой оболочки амилоида А, вследствие чего дендритные клетки активируют регуляторные Т-клетки Th17, которые продуцируют в больших количествах IL-17A и IL-17F и в умеренных количествах IL-22 и IFN- $\gamma$  (Kim, Yoo et al., 2016; Cunha, Vern et al., 2019). Последние необходимы для защиты слизистых оболочек и восстановления их целостности, а также для синтеза дефензинов (например REGIII $\gamma$  и REGIII $\beta$ ) (Chase and Kaushik, 2019).

Сведений о лимфоидной ткани, ассоциированной с рубцом, в данный момент недостаточно, однако популяции лейкоцитов в рубцовой жидкости (среди которых моноциты, Т- и В-клетки), вероятно, играют важную роль в регуляции иммунных и биохимических параметров у КРС (Trevisi, Riva et al., 2018). Так, экспрессия CD45 в рубцовой жидкости (что указывает на инфильтрацию лейкоцитов) отрицательно коррелировала с pH в рубце, в то время как на встречаемости В-клеток (а также общих уровнях IgG и IgM) негативно сказывался pH в рубце (низкий сильно кислотный) и высокие концентрации летучих жирных кислот. Кроме того, проблемы с рубцом (такие как ацидоз рубца в подострой форме) приводили к дисбиозу в рубце, вследствие чего нарушалась целостность эпителия и развивалось воспаление (Aditya, Humer et al., 2017).

Ассоциированная со слизистыми оболочками лимфоидная ткань (MALT) встречается в организме по-

всеместно, что позволяет проводить отбор антигенов на поверхностях слизистых оболочек. Различают лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником, бронхами, носоглоткой, а также лимфоидную ткань в репродуктивном и выделительном трактах, молочных железах, слезных и слюнных железах. Эти скопления лимфоцитов или фолликулы (также известные как лимфоидные фолликулы либо пейеровы бляшки в кишечнике) В-клеток, Т-клеток, дендритных клеток и антиген-представляющих клеток выстланы специализированными эпителиальными клетками — М-клетками (найдены в бронхах, кишечнике и матке) (Brandtzaeg, Kiyono et al., 2008; Brandtzaeg, 2011; Wira, Fahey et al., 2014). Лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, является крупнейшим лимфоидным органом в организме и наиболее обширной поверхностью в теле, контактирующей с огромным разнообразием пищевых и микробных антигенов. М-клетки поглощают антигены путем пиноцитоза и транспортируют их сквозь эпителий слизистой оболочки, где идет их процессинг антиген-представляющими клетками и представление их Т- и В-лимфоцитам (Inman, Haverson et al., 2010; Wira, Fahey et al., 2014). Затем простимулированные антигеном Т- и В-клетки совместно продуцируют IgA. Некоторые из них экспрессируют на поверхности мембранны особые молекулы — хоминг-рецепторы и покидают лимфоидную ткань, входя в кровоток; они могут впоследствии через эндотелий венул попасть в собственную пластинку. В конечном итоге эта локальная стимуляция приводит к тому, что Т- и В-клетки памяти могут мигрировать в близлежащие и удаленные слизистые оболочки и другие ткани — все это относится к «общей иммунной си-

стеме слизистых оболочек» (Chase and Kaushik, 2019), частью которой является так называемый энтеро-маммарный путь, необходимый для выживания и поддержания здоровья новорожденных телят (Niemialtowski, Schollenberger et al., 2005). Этот эндогенный канал связи между кишечником и молочными железами не только позволяет лимфоцитам поступать в молочную железу, но и обеспечивает транспорт ряда бактериальных компонентов во время лактации (Young, Hine et al., 2015).

## Системный иммунитет

Подавляющее большинство патогенов проникает в организм сквозь слизистые оболочки, где индуцирует первичный иммунный ответ. Однако эти ранние события приводят со временем к развитию локального, а затем и системного иммунитета, который может играть как первую, так и второстепенную роль в выводе патогенов из организма и формировании иммунологической памяти. Несмотря на то, что иммунный ответ в слизистых оболочках важнее для выведения из организмов многих патогенов (особенно поражающих ЖКТ и дыхательную систему), в отношении многих агентов вирусной и бактериальной природы, вызывающих системные и хронические расстройства, а также инфекции лимфоидных органов, защитный иммунитет и элиминация патогенов невозможны без мощной системной реакции. К таким патогенам относятся *Staphylococcus aureus*, вирус ящура, респираторно-синцитиальный вирус KPC, *Haemophilus somnis* и *Mycoplasma bovis* (Widders, Paisley et al., 1986; Kimman, Westenbrink et al., 1987; Leitner, Yadlin et al., 2000; Eschbaumer, Stenfeldt et al., 2016).

Изучение иммунного ответа в отношении этих патогенов позволило идентифицировать как ряд общих черт системного иммунитета, так и ряд отдельных системных реакций. С возрастшим уровнем защиты коррелировали преобладание IgG1 и IgG2 в сыворотке крови (в отличие от IgA, присутствующих в секретах слизистых оболочек), а также мощный и сбалансированный Т-клеточный ответ при участии лимфоцитов, экспрессирующих CD4+ или CD8+, и рост уровня интерферонов типа I. Другой патоген, часто встречающийся у КРС, *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*), проникает в организм через поврежденную кожу или слизистые оболочки, после чего распространяется вместе с кровотоком, что потенциально может привести к развитию почечной инфекции (Ko, Goarant et al., 2009). Во время начальной фазы заболевания симптомы неспецифичны, вследствие чего лептоспироз диагностируется недостаточно эффективно и слабо контролируется при помощи вакцинации. Было показано, что прайминг агонистом TLR2/NOD2 внутрибрюшинно индуцирует системную реакцию при участии механизмов врожденного иммунитета, характеризующуюся выработкой провоспалительных цитокинов, хемокинов и оксида азота макрофагами вне зависимости от наличия или отсутствия В- и Т-клеток (Santecchia, Vernel-Pauillac et al., 2019).

Несмотря на то, что свежие данные исследований указывают на важность системного иммунного ответа при протекании некоторых инфекций, в то же время очевидно, что тканеспецифические иммунные механизмы также могут играть важную роль в защите от тех или иных патогенов, и более глубокое понимание данных процессов требует дальнейшего изучения.

## Патогены, ассоциированные с иммунопатологией

Некоторые значимые патогены КРС эволюционировали таким образом, что приобрели механизмы «обмана» иммунной системы и тем самым способность вызывать перsistентное заражение. Механизмы эти многочисленны и не до конца исследованы, и вакцинация, а также другие средства борьбы с этими инфекциями зачастую проблематично или вовсе невозможно использовать. Мы коротко опишем стратегии, используемые некоторыми из этих патогенов для супрессии иммунного ответа хозяина, а также механизмы, благодаря которым они модифицируют сами себя или меняют местонахождение в организме хозяина, с тем чтобы предотвратить распознавание их иммунной системой.

Так, вирус вирусной диареи (ВВД) в ходе эволюции получил способность вызывать перsistентное заражение по причине иммунологической толерантности в отношении нецитопатогенных вариантов вируса (Peterhans, Jungi et al., 2003). По причине супрессорного действия на механизмы как врожденного, так и приобретенного иммунитета ВВД является важным фактором, повышающим восприимчивость животных к возбудителям респираторных заболеваний. Интересно, что нецитопатогенные варианты ВВД угнетают также выработку интерферонов типа I и провоспалительных цитокинов в альвеолярных макрофагах КРС, в то время как цитопатогенные варианты, напротив, такую реакцию индуцируют. Такая супрессия в свою очередь ведет к снижению уровня фагоцитарной активности. Кроме того, зараженные нецитопатогенным ВВД клетки также не реагируют на индукцию интерферона в присутствии двуцепочечной РНК, очень активно-

го стимулятора синтеза интерферонов типа I. Помимо этого, при инокуляции *in vitro* макрофагов моноцитарного происхождения как цитопатогенным, так и нецитопатогенным ВВД наблюдали пониженную чувствительность к лигандам рецепторов TLR2, TLR3, TLR4, но не TLR7 (Schaut, Ridpath et al., 2016). Так как выработка интерферона  $\alpha$  необходима для запуска механизмов адаптивного иммунитета, инактивация этого процесса нецитопатогенным ВВД, возможно, является ключевым фактором, влияющим на механизмы как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Отчасти как и *in vitro*, *in vivo* ВВД тоже модулирует способность моноцитов и макрофагов реагировать на стимуляцию посредством рецепторов TLR4 (Schaut, McGill et al., 2015).

Другим патогеном, вызывающим иммунопатологическое состояние, является вирус лейкоза (ВЛКРС). При заражении им наблюдается повышение численности популяции клеток CD4+CD25+Foxp3+Treg, вырабатывающих в больших количествах трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), что приводит к снижению уровня синтеза интерферона гамма и фактора некроза опухоли  $\alpha$  Т-лимфоцитами CD4+ и нарушению функционирования NK-клеток (Suzuki, Konnai et al., 2013; Ohira, Nakahara et al., 2016). Эти иммунологические нарушения имеют следствием повышение восприимчивости к оппортунистическим инфекциям. Кроме того, у животных с персистентным лимфоцитозом в присутствии ВЛКРС отмечали снижение уровня выработки лимфоцитами противовирусных цитокинов (включая IFN- $\gamma$ , IL-2 и IL-12) и снижение их пролиферативной способности (Ikebuchi, Konnai et al., 2011). При заражении *Mycobacterium avium*, напротив, защитная реакция, опосредованная клетками Th1, на более позд-

них фазах инфекции угнетается, в то время как не обладающие защитным потенциалом реакции, опосредованные клетками Th2, становятся все более заметными. Свежие данные указывают на то, что невосприимчивость Т-клеток, а не поведение клеток Treg, обусловливает этот сдвиг Th1/Th2 (Roussey, Steibel et al., 2014).

Новые исследования позволили нам лучше понять феномены истощения и дисфункции антиген-специфических Т-клеток при хронических заболеваниях КРС. Так, было продемонстрировано, что повышающая регуляция экспрессии на поверхности Т-клеток КРС иммуноингибиторных рецепторов, таких как receptor программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3), receptor, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен 3 (Tim-3), и цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4), играют ключевую роль в развитии иммунного истощения и в ходе течения болезни при заражении лейкозом, болезнью Йоне (возбудитель *Mycobacterium avium*), анаплазмозом (Palomares, Hurley et al., 2014; Leite, Es-labao et al., 2015; Okagawa, Konnai et al., 2016; Okagawa, Konnai et al., 2016; Konnai, Murata et al., 2017).

Интересно, что при заражении вирусом ящура некоторые животные способны его элиминировать в течение 1–2 недель, в то время как другие оставались персистентно инфицированными на сроки до 3 лет (Arzt, Baxt et al., 2011). Данная дихотомия и механизмы ухода вируса ящура от цитотоксических Т-клеток полностью не изучены, и потребуются дальнейшие исследования для уточнения этих вопросов и установления, каким образом статус носителя и опосредованная вирусом ящура иммуномодуляция могут повлиять на восприимчивость КРС к другим патогенам.

## Функционирование иммунитета во время стельности и отела

Сложные гормональные сдвиги и сдвиги в функционировании иммунной системы имеют место на ранних стадиях стельности у коров: при зачатии тормозится лутеиновая регрессия, чтобы поддерживать выработку прогестерона на должном уровне во избежание атаки на плод материнской иммунной системы. В недавних исследованиях оценивался уровень иммунной регуляции в материнской матке, мононуклеарных лимфоцитах периферической крови и желтом теле, на которую непосредственно влияет интерферон тау (IFN- $\tau$ ), основная сигнальная молекула при беременности у КРС (Talukder, Yousef et al., 2017). Результаты данных исследований указывали на то, что эмбрион у КРС стимулирует противовоспалительную реакцию в иммунных и эпителиальных клетках. Также существуют данные, согласно которым повышается уровень экспрессии TLR, а также рекрутинга и активации макрофагов в эндометрии коров на ранних стадиях стельности (Oliveira, Barreto et al., 2012).

Однако причины последнего феномена до конца не понятны. Помимо интерферона тау, на ранних стадиях стельности концептус секretирует плацентарный лактоген, ассоциированные с беременностью протеины, простагландин E2, неклассический комплекс гистосовместимости класса I, факторы транскрипции GATA, пролактин-родственный белок, Cox-2 и IL-6. Высказывалось предположение, что интерферон тау и другие сигнальные факторы эмбриона (см. рис. 1) могут быть вовлечены в системную регуляцию иммунитета коровы, осуществляя модуляцию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, кровяных пластинок и находящейся вне клетки эмбриональной ДНК в лимфотоке и кровотоке (рис. 1). Помимо антилютеолитического действия, интерферон тау повышает имплантационную готовность матки и развитие эмбриона. Он также повышает уровень экспрессии генов, стимулируемых интерфероном (в том числе фактора некроза опухоли  $\alpha$  и моноцитарного хемотаксического белка 1) в тканях эндометрия коров (Mansouri-Attia, Oliveira et al., 2012).

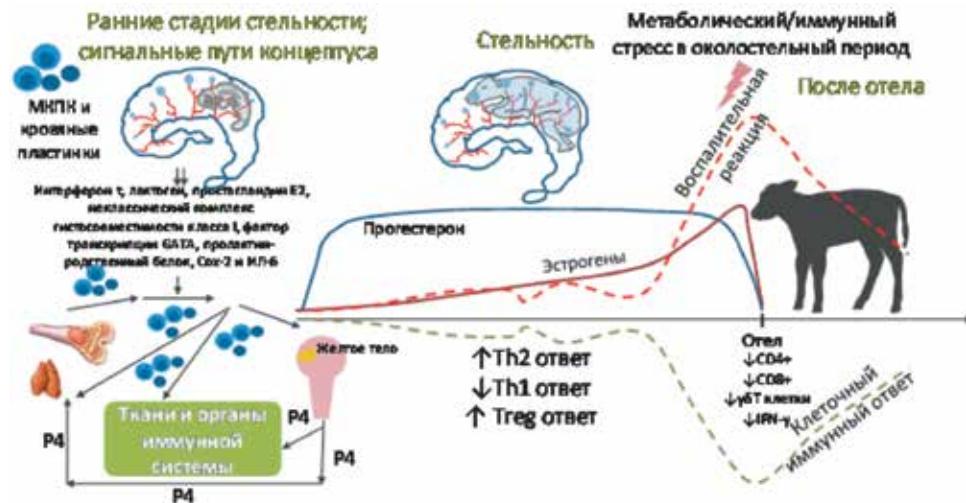


Рис. 1. Иммуномодуляция в период стельности. Сигнальная система концептуса на ранней стадии моделирует локальный и системный иммунитет.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), тромбоциты и внеклеточная ДНК из костного мозга/тимуса под действием прогестерона из желтого тела попадают в кровоток. После этого МКПК, тромбоциты и внеклеточная ДНК мигрируют в эндометрий и подвергаются воздействию интерферона гамма и других иммунных факторов концептуса. Затем функционально модифицированные МКПК, тромбоциты и внеклеточная ДНК снова проникают в кровоток/лимфоток и достигают эффективных клеток, от которых зависит работа органов иммунной системы и неиммунных органов, таких как яичники. Так на ранних стадиях стельности происходит сдвиг всей иммунной системы в сторону активности Th2, чтобы сохранять состояние стельности. В околостельный период воспалительные реакции резко учащаются и угнетается работа механизмов клеточного иммунитета

Материнский иммунный ответ во время развития эмбриона у КРС заключается в том числе в возрастании численности моноцитов и дендритных клеток в строме эндометрия, в то время как моноцитарные хемотаксические белки 1 и 2 служат потенциальными хемотаксическими факторами для клеток этих двух популяций (Mansouri-Attia, Oliveira et al., 2012). В дополнение к этому субпопуляция (M2) активированных макрофагов и нескольких цитокинов, включая интерферон  $\gamma$ , интерлейкин-4 и фактор ингибирования лейкемии (LIF), снижают уровень активации иммунного ответа, направленного на эмбрион (O'Gorman, Al Naib et al., 2010; Oliveira, McClellan et al., 2010; Al Naib, Mamo et al., 2011).

Эти изменения на ранних этапах стельности в сочетании с высоким уровнем прогестерона (*P4*, рис. 1) приводят к сдвигу баланса в сторону Th2 и его поддержанию вплоть до сухостойного периода (Maeda, Ohtsuka et al., 2013; Paibomesai,

Sharif et al., 2018). Тем не менее после отела соотношение концентраций Th1/Th2 должно вырасти, чтобы обеспечить быстрый переход от толерантности в отношении плода (высокий уровень Th2) к защите от инфекционных агентов (высокий уровень Th1) (Trevisi and Minuti, 2018). Существуют также скучные данные, указывающие на частичную иммуносупрессию у коров в сухостойный период: уровень в периферической крови CD4+, CD8+ и  $\gamma\delta$ T-клеток, а также интерферона гамма падает, в то время как концентрация CD25+ Т-клеток увеличивается (Oliveira, Barreto et al., 2012). Данные наблюдения могут говорить о том, что перед отелом имеет место еще один иммунологический сдвиг. Heyland et al. (2006) предположили, что незадолго до и вскоре после отела многочисленные повреждающие факторы извне способны индуцировать системную воспалительную реакцию, которая в том числе ослабляет работу механизмов клеточного иммунного ответа (Heyland, Dhaliwal et al., 2006) (рис. 1). Помимо этого, в некоторых других работах получены данные, указывающие на иммуноопосредованную природу высвобождения оболочек плода, поскольку повышенная вероятность задержания последа коррелировала с совпадением антигенной специфичности MHC I у коровы и ее потомства (Benedictus, Thomas et al., 2012).

В настоящее время достоверно известно, что по мере приближения даты отела коровы начинают употреблять меньше корма (~30%) (Bertics, Grummer et al., 1992). Молочные коровы не получают в достаточном количестве нутриенты, необходимые для поддержания лактации, что приводит к отрицательному энергетическому балансу. Последний в свою очередь ведет к иммуносупрессии или плохо контролируемому воспалению, что повышает риски развития заболеваний матки (Ingvartsen and Moyes, 2013).

Таким образом, функционирование иммунной системы и ее контроль во время стельности с момента зачатия до отела представляет собой крайне сложный процесс, включающий в себя селективную супрессию и повышающую регуляцию отдельных иммунных механизмов. Данные аспекты требуют дальнейшего изучения и принятия в расчет для поддержания оптимального состояния здоровья как коров в сухостойный период, так и новорожденных телят.

## Иммунные механизмы в молочной железе

Способность коров в период лактации защищаться от различных патогенов (бактерий) и их элиминировать большей частью зависит от иммунной системы молочной железы, хотя немаловажную роль играют также системные механизмы. Важно, что телята рождаются агаммаглобулиномицными, так как трансплацентарного транспорта имму-

ноглобулинов у КРС нет, и полностью зависят от молозива и молока в том, что касается обеспечения пассивного иммунитета на должном уровне (Barrington and Parish, 2001).

Молочная железа коров обладает анатомическим барьером неиммунной природы, и в ее пределах также осуществляется работа широкого спектра иммунных механизмов, в том числе за счет координации механизмов врожденного и приобретенного иммунитета (Borghesi and Milcarek, 2007). В обзорах Rainard (Rainard and Riollet, 2006), Ezzat Alnakip (Ezzat Alnakip, Quintela-Baluja et al., 2014) и Sordillo (Sordillo, 2018) подробно описаны иммунобиология молочной железы коров и задействованные в ее тканях иммунологические механизмы, полагающиеся как на упомянутые выше универсальные клеточные и растворимые компоненты иммунной системы, так и некоторые уникальные биохимические, механические и иммунные факторы (рис. 2). К числу последних относится барьер

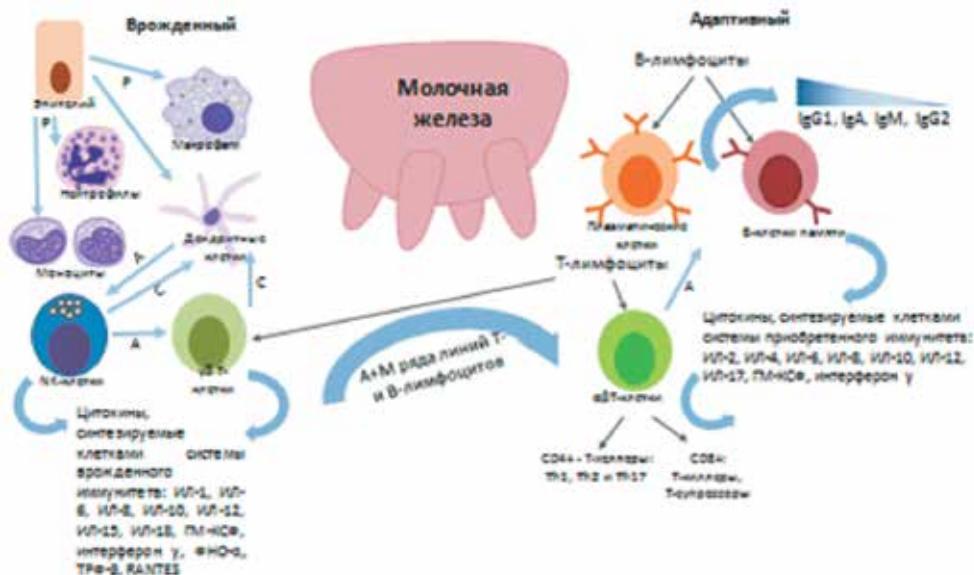


Рис. 2. Иммунные клетки молочной железы, их функции и синтезируемые ими цитокины.  
A — активация, C — созревание, P — регуляция

соскового протока, в рамках которого функционируют следующие факторы защиты: сокращение сосковых сфинктеров, блокирующее проникновение бактерий; бактериостатическое действие кератина и розетки Фюрстенберга, густо заселенные лейкоцитами. Один из растворимых компонентов, секретируемых молочной железой, — лактоферрин является одним из наиболее детально описанных антимикробных протеинов и притом активно связывающим железо, благодаря чему значительно снижается концентрация растворимого железа, доступного для размножающихся бактерий. Трансферрин, лизоцим, лактопероксидаза и ксантиновая оксидаза также присутствуют в молоке жвачных животных и тем или иным образом воздействованы в антибактериальной защите (Rainard and Riollet, 2006).

В молочной железе присутствуют клетки разнообразных линий дифференцировки, выполняющие различные иммунные функции, в том числе эпителиальные клетки, клетки врожденной иммунной системы, а также Т- и В-лимфоциты (рис. 2). Эти клетки взаимодействуют напрямую или через посредство растворимых компонентов, чтобы обеспечить оптимальную защиту вымени от бактерий и защиту телят благодаря молозиву и молоку.

Из всех Toll-подобных рецепторов для защиты тканей молочной железы наиболее важны TLRs, TLR2 и TLR4, так как эти рецепторы распознают паттерны микробных агентов/патогенов, характерные для грамположительных (пептидогликаны) и грамотрицательных (липолипосахариды) агентов, вызывающих мастит, в том числе *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* и *Escherichia coli* (Goldammer, Zerbe et al., 2004). Несмотря на то, что быстрый и мощный воспалительный ответ способен эффективно заблокировать развитие инфекции или

ее элиминировать, слишком продолжительное воспаление может привести к повреждению собственных тканей организма. В свете этого трудно переоценить роль иммунорегуляторных механизмов молочной железы, благодаря которым прекращается синтез провоспалительных цитокинов и начинается их катаболлизм. Интерлейкины 4, 10 и 17, а также оксилипиды (регулирующие микроциркуляторное русло и про-/противовоспалительные реакции) имеют критическое значение для нормализации состояния при воспалении (Bannerman, 2009). Также подробно описан вклад системы комплемента в работу защитных механизмов молочной железы (Rainard 2003; Rainard, 2005). Система комплемента не запускается по классическому пути в связи с отсутствием компонента C1q, однако альтернативный путь остается возможным, в ходе чего на поверхности бактериальных клеток накапливаются опсонины C3b и C3bi и генерируется провоспалительный фрагмент C5a (Rainard and Riollet, 2006). Естественные антитела, стимулирующие опсонизацию бактерий, являются другим важным врожденным гуморальным защитным механизмом. Как правило, опсонизирующие антитела относятся к изотипам IgG2 и IgM, между тем в молоке и сыворотке крови коров опсонизирующие антитела большей частью представлены IgM (Rainard and Riollet, 2006).

Иммуноглобулины, специфичные в отношении вирусов и бактерий, являются наиболее важными гуморальными растворимыми факторами иммунной защиты в тканях молочной железы, относящимися к системе адаптивного иммунитета, связывающей клеточную и гуморальную системы. Четыре класса иммуноглобулинов (IgG1, IgG2, IgA и IgM) вносят вклад в защиту от бактерий и играют каждый свою роль в зависимости от стадии лактации. Наиболее высока концентрация в молоке и моло-

зиве коров IgG1 (Barrington, Besser et al., 1997; Ezzat Alnakip, Quintela-Baluja et al., 2014), в то время как уровень IgG2 заметно возрастает по мере развития воспаления (Korhonen, Marnila et al., 2000) (рис. 2).

Иммуноглобулины в молоке могут как попадать в него из кровотока, так и производиться плазматическими клетками локально после активации антигенами (Shafer-Weaver, Pighetti et al., 1996). Таким образом, в отличие от моногастрических животных, у КРС преобладающие в молозиве и молоке иммуноглобулины (IgG1) активно транспортируются из периферической крови (а не из кишечника), что означает возможность парентеральной вакцинации стельных коров для повышения уровня IgG1 с их последующим транспортом в молозиво и молоко (Larson, Heary et al., 1980). Активный транспорт IgG опосредуется неонатальным рецептором Fc — процесс этот внутриклеточный, двунаправленный и pH-зависимый (Vaughn and Bjorkman, 1998).

Эти особенности организма коров требуют дальнейшего изучения для того, чтобы обеспечить новорожденным телятам оптимальную защиту за счет материнского иммунитета при вакцинации коров.

## Защита новорожденных телят за счет пассивного иммунитета

Молозиво и молоко коров содержат основные нутриенты и факторы пассивного иммунитета, необходимые для защиты телят в постнатальный период. В молоке и молозиве содержатся казеин, лактоферрин, протеины сыворотки и лактопероксидаза, а также эпителиальные и иммунные клетки — макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Эти клетки пересекают барьер в кишечнике теленка и заселяют

периферические и центральные лимфоидные ткани, что способствует развитию его иммунной системы (Liebler-Tenorio, Riedel-Caspari et al., 2002). В молозиве коров также содержатся мощные биоактивные компоненты, способствующие росту организма — эпидермальный фактор роста и трансформирующий ростовой фактор  $\beta$ , — противодействующие патогенам провоспалительные цитокины (интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-6, фактор некроза опухоли  $\alpha$  и интерферон  $\alpha$ ), усиливающие функционирование лимфоцитов и ускоряющие формирование иммунной системы в слизистой оболочке кишечника (Kessler, Bruckmaier et al., 2020). Концентрации цитокинов в молозиве коров намного выше по сравнению с молоком, а это стимулирует выработку секреторных IgA, а также иммунный ответ при участии Th1- и Th2-клеток (Wheeler, Hodgkinson et al., 2007). Молозиво, кроме того, содержит иммуноглобулины матери и иммуномодуляторные факторы, подавляющие формирование активного иммунитета (Butler, Zhao et al., 2009).

Таким образом, в дополнение к своей питательной функции, секрет молочной железы играет по меньшей мере две другие важные роли: обеспечение толерантности к пищевым антигенам и комменсальной микрофлоре, одновременно с этим стимулируя развитие иммунной системы и иммунного ответа к патогенам. Поскольку пассивный транспорт лактогенных растворимых и клеточных компонентов от коровы к теленку является основным путем защиты потомства в неонатальный период от инфекций, нарушение такого транспорта (например ввиду проблем со здоровьем у коровы, позднего начала кормления или низкого качества молозива) становится причиной гибели более чем 30% телят в период до отъема (Stilwell and Carvalho, 2011). Одной из

рабочих стратегий для минимизации ущерба в случаях нарушения передачи пассивного иммунитета является коммерчески доступное молозиво, которое телята получают дополнительно (Chamorro, Cernicchiaro et al., 2017).

В молочных хозяйствах молодняк большей частью питается пастеризованным отбракованым молоком и заменителями молока (Palczynski, Bleach et al., 2020). Доступные в настоящее время на рынке заменители молока чаще всего производятся из обезжиренного сухого молока, растительного либо животного жира, сухой пахты, сывороточного протеина, соевого лецитина и витаминно-минеральных премиксов (USDA, 2008). Несмотря на то, что их пищевая ценность улучшилась за последние несколько десятилетий, иммунологически активных компонентов и факторов, стимулирующих рост организма, в таких коммерческих продуктах по-прежнему недостаточно, что приводит к более высокой восприимчивости к инфекционным заболеваниям.

Данные наблюдения указывают на то, что практика преждевременного отъема телят нуждается в некоторой оптимизации. Сходным образом при разработке стратегий вакцинации стельных коров необходимо учитывать поддержание оптимального состояния здоровья коров и обеспечение пассивной защиты их потомства.

## Иммунная система и микробиом

Симбиотические отношения между млекопитающими и их микробиомом являются для первых жизненно важными, так как хозяин извлекает из них преимущества в таких аспектах, как питание и развитие, а также преимущества физиологические и иммунологические (Gomez, Galvao et al., 2019). Как и у

большинства млекопитающих, фекальная микробиота у КРС большей частью представлена бактериями пяти типов: *Firmicutes* (наиболее многочисленный, 63,84%–81,90%), *Bacteroidetes* (8,36%–23,93%), *Proteobacteria* (3,72%–9,75%), *Fusobacteria* (0,76%–5,67%) и *Actinobacteria* (1,02%–2,35%) (Oikonomou, Teixeira et al., 2013). Как и у животных других видов, у КРС разнообразие микроорганизмов в фекалиях коррелирует с рационом, возрастом, наличием/отсутствием инфекционных заболеваний и пребыванием/непребыванием организма в состоянии роста, — при этом считается, что обилие *Faecalibacterium spp.* способствует росту организма (Oikonomou, Teixeira et al., 2013).

Формирование микробиома кишечника представляет собой динамический процесс, влиять на который способен целый ряд внутренних и внешних факторов. Среди факторов, зависящих от собственных свойств организма, следует отметить функциональную зрелость пищеварительного тракта и иммунной системы, секрецию желчи и репертуар бактериальных рецепторов в слизистой оболочке (Mackie, Sghir et al., 1999; Willing, Gill et al., 2010). Спектр же внешних факторов намного шире и включает нутрициологический статус теленка, состав вагинальной и фекальной микрофлоры коровы, а также микрофлоры в ее молоке, присутствие в рационе антибиотиков и др. (Gomez, Galvao et al., 2019). По мере того, как теленок растет, меняется и состав кишечной микрофлоры, в результате имеет место «кульминационный» момент, когда сообщество микроорганизмов начинает само поддерживать постоянство анаэробной среды в ЖКТ (Chase, 2018).

Обильна и многочисленна микробиота рубца — анаэробного метаногенного отдела желудка жвачных:  $\sim 10^{10}$ – $10^{11}$  клеток/мл и более 200 видов бактерий, —

именно они отвечают за уникальную способность КРС преобразовывать неперевариваемую растительную массу в необходимые для жизнедеятельности питательные вещества (Matthews, Crispie et al., 2019).

Бактерии являются наиболее многочисленными микробами, обитающими в рубце, и их видовой состав определяется рядом факторов, в том числе рационом, энергетическими потребностями и восприимчивостью к некоторым побочным продуктам метаболизма, которые для некоторых организмов могут быть токсичны. В нескольких работах было продемонстрировано, что обитающие в рубце бактерии у животных, чей рацион был богат кормовыми растениями или зерном, были, соответственно, большей частью грамотрицательными или грамположительными (в их числе были и *Lactobacillus*), в то время как повышенное содержание в корме кукурузного силюса имело следствием повышенное содержание *Prevotella* и снижение численности простейших (Hungate, 1966; Lett at and Benchaar, 2013).

Многочисленные исследования продемонстрировали, что для огромного процента представителей микробиома так и не были получены культуры, тем не менее фундаментальные различия, обусловленные рационом, были зарегистрированы в содержании гликозид-гидролаз (Brulc, Antonopoulos et al., 2009). В другой недавней работе подчеркивается важность микробиоты рубца и высказывается предположение, что у разных пород молочных коров она обуславливает различия в некоторых аспектах метаболизма, работы иммунных механизмов и продуктивности (Xue, Sun et al., 2020).

Центральные (например костный мозг и тимус) и периферические (например лимфатические узлы, селезенка и лимфоидная ткань, ассоциированная

со слизистыми оболочками) органы иммунной системы теленка развиваются в пренатальный и постнатальный период при содействии микробиоты матери, а также его собственной (Barrington and Parish, 2001; Gomez, Galvao et al., 2019). В течение первых 24–36 часов жизни теленка проницаемость его кишечника резко падает в связи с повышением уровня экспрессии белков плотных соединений (окклюдина, клаудина и молекул адгезии плотных контактов).

Несмотря на то, что точные механизмы неизвестны, взаимодействия между эпителием слизистой оболочки и некоторыми бактериями (например *Lactobacillus spp* и *Bifidobacterium spp*) или метаболитами бактерий осуществляют повышающую регуляцию экспрессии белков плотных контактов, тем самым укрепляя барьеры в желудочно-кишечном тракте (Sultana, McBain et al., 2013). Выработка слизи — другого защитного барьера — также стимулируется в присутствии некоторых комменсальных бактерий (Enss, Grosse-Siestrup et al., 1992).

В обзоре Gomez et al. резюмируются накопившиеся за последнее время данные, полученные при помощи различных моделей и указывающие на то, что комменсальная микрофлора стимулирует обновление энтероцитов и ускоряет метаболизм, стимулирует синтез антимикробных пептидов энтероцитами и клетками Панета, а также выработку секреторных IgA (Gomez, Galvao et al., 2019). Низкий уровень секреторных IgA коррелирует с усилением пролиферации бактерий, что ведет к системному воспалению и/или диарее (Cunningham-Rundles, 2001). Несмотря на то, что была установлена связь между чрезмерной пролиферацией бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и диареей у телят (Gomez, Arroyo et al., 2017), роль секреторных IgA при таких расстройствах неизвестна и требует дальнейшего

изучения. Кроме того, экспрессия TLR2 и TLR6 угнетается по мере взросления телят, что коррелирует с ростом концентрации бактерий в целом и лактобактерий в частности в переваренной пище и тканях (Malmuthuge, Li et al., 2012). Экспрессия TLR-рецепторов в кишечнике телят очень сильно зависит от отдела кишечника и может объясняться разным составом микробных сообществ в разных участках ЖКТ (Malmuthuge, Li et al., 2012). Также не исключено, что колонизация кишечника телят *Lactobacillus spp* и *Bifidobacterium spp* индуцирует регуляторный иммунный ответ (повышение уровня секреции интерлейкина-10), тем самым избегая воспалительных реакций в ответ на присутствие комменсальной микрофлоры (Weng and Walker, 2013).

В настоящее время доступны данные исследований, в ходе которых сравнивались системные иммунные реакции у стерильных и обычных телят, и появляется все больше доказательств ассоциативного характера, подтверждающих, что коррелирующие с изменениями в микробиоме изменения в функционировании иммунной системы наблюдаются как в кишечнике, так и системно. Например, стресс, который животные переносят при объединении разных групп, транспортировке, отъеме и других резких переменах рациона могут привести к изменению состава микрофлоры и, как следствие, к дисбиозу кишечника. Дисбиоз и сопутствующие ему иммунологические изменения могут в свою очередь повысить восприимчивость телят к некоторым инфекционным заболеваниям, таким как болезнь Йоне или паратуберкулез (Derakhshani, De Buck et al., 2016). В другой работе наблюдали системную иммуномодуляцию, когда в крови коров, получивших лизоцим, молочную кислоту и гликопептид, выделенный из *Lactobacillus spp*, зарегистрировали снижение численности

Т-хелперов (но не экспрессирующих CD8+ клеток), численности клеток, экспрессирующих CD25+, CD38+, CD69+ и CD95+, а также повышение вероятности экспрессии рецепторов интерлейкина-2 на поверхности клеток. Эти изменения коррелировали с повышением содержания соматических клеток и снижением концентрации патогенных бактерий в молоке коров, получивших названный препарат (Gulbe, Pilmane et al., 2020).

## Иммунная система и питание

Нутрициологический статус и метаболизм у молочных коров крайне важны для адекватного функционирования иммунной системы и осуществления других клеточных функций. Влияние питания может быть прямым, через посредство питательных веществ, или косвенным — при участии метаболитов. Проблемы со здоровьем у молочных коров часто наблюдаются в сухостойный период ввиду гормональных сдвигов и необходимости адаптироваться к возросшей потребности в питательных веществах с началом лактации, из-за чего развивается отрицательный энергетический баланс. Неконтролируемое воспаление, коррелирующее с особенностями рациона, считается фактором, вклад которого важен при развитии ряда метаболических заболеваний, часто поражающих животных в молочных хозяйствах, таких как мастит, задержание последа, метрит, смешение сычуга и кетоз (Sordillo, 2016). В прошлом было продемонстрировано, что в сухостойный период коровы, недополучающие питательных веществ или получающие их слишком много, более восприимчивы к различным инфекционным заболеваниям по сравнению с животными, чей

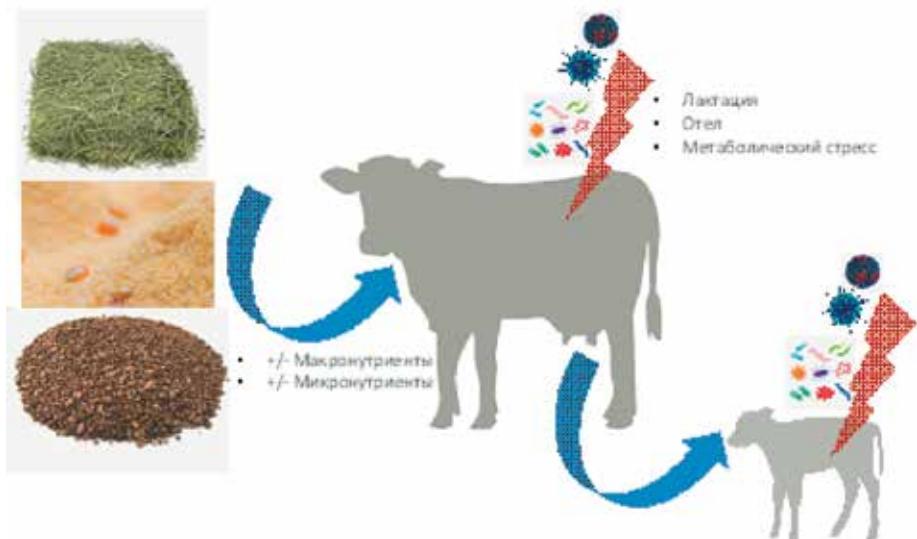


Рис. 3. Связь между питанием, стрессом (отел, метаболический и лактационный стресс) и восприимчивостью коровы и теленка к бактериальным и вирусным патогенам

Таблица 3. Роль макро- и микронутриентов в функционировании иммунной системы у КРС

Нутриент	Значение для иммунной системы
Жиры/энергия	Регуляция клеточного и гуморального иммунитета. Состав жирных кислот в иммунных клетках влияет на фагоцитоз, сигнальные механизмы Т-клеток и антиген-представляющую способность
Белки	Белок и аминокислоты необходимы для пролиферации и созревания клеток иммунной системы. Отдельные аминокислоты (триптофан, аргинин, глутамин и др.) требуются для оптимальной работы иммунных механизмов на системном уровне и в кишечнике
Глюкоза	Повышающая регуляция пролиферации и дифференцировки клеток, их выживания, хемотаксиса, фагоцитоза
Глутамин	Повышающая регуляция выработки цитокинов и реактивных кислородных метаболитов (ROM), а также клеточного деления, фагоцитоза и пролиферации CD4 Т-клеток
Триптофан	Активация и поддержание уровня иммунного ответа
Жирные кислоты	Понижающая регуляция секреции IgM, выработки цитокинов, жизнеспособности клеток, фагоцитоза, диапедеза и представления антигенов. Повышающая регуляция реакции «кислородного взрыва», некротических процессов, фагоцитоза, выработки цитокинов и реактивных кислородных метаболитов, работы TLR-опосредованных сигнальных механизмов
Селен	Поддержание работы антиоксидантных агентов, повышение интенсивности работы нейтрофилов и миграции макрофагов
Цинк	Важен для иммунной системы в целом, работы антиоксидантных агентов (входит в состав супероксиддисмутазы), поддержания целостности эпителиального барьера, синтеза белков и нуклеиновых кислот, клеточного деления

*продолжение таблицы*

Нутриент	Значение для иммунной системы
Медь	Важна для иммунной системы в целом, работы антиоксидантных агентов (входит в состав супероксиддисмутазы), повышение уровня выработки интерферонов
Железо	Участие в работе антиоксидантных механизмов (необходимый компонент каталазы), энергетического и белкового обмена, протекания окислительно-восстановительных реакций
Марганец	Важен для иммунной системы в целом, работы антиоксидантных агентов (входит в состав супероксиддисмутазы), углеводного и липидного обмена
Хром	Регуляция механизмов клеточного и гуморального иммунитета, повышающая регуляция бластогенного ответа, усиление выработки цитокинов (интерлейкина-2, интерферонов и ФНО- $\alpha$ ) мононуклеарными клетками, также важен для продукции антител
Витамин А/β-каротин	Важен для иммунной системы в целом, повышающая регуляция пролиферации лимфоцитов
Витамины группы В	Антиоксидантное действие, повышающая регуляция пролиферации лимфоцитов
Витамин D	Антиоксидантное действие, понижающая регуляция воспалительных процессов
Витамин С	Антиоксидантное действие, понижающая регуляция воспалительных процессов
Витамин Е	Жирорастворимый антиоксидант, повышение интенсивности работы нейтрофилов, уровня продукции интерлейкина-1 и экспрессии молекулярного комплекса гистосовместимости класса II

нутрициологический статус был оптимальен (Heuer, Schukken et al., 1999). Несколько противоречивые данные по корреляции непродолжительных ограничений в питании с падением интенсивности работы нейтрофилов и развитием воспалительных заболеваний у коров в период после отела рассмотрены Sordillo (Sordillo, 2016).

Получение животными необходимых антиоксидантов, включая омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, коньюгированную линолевую кислоту и витамин D, стимулирует противовоспалительный ответ (Haubold, Kroger-Koch et al., 2020). Дефицит некоторых микронутриентов (витаминов и минералов) коррелирует с ростом заболеваемости в случае мастита, задержания последа и метрита (Zhao, Li et al., 2015). В ряде обзоров обобщены данные по иммуномодуляторным и антиоксидантным эффектам различных макро- и микро-

нутриентов, влияющих на вероятность возникновения проблем со здоровьем у молочных коров, и мы приводим в табл. 3 краткое резюме (Andrieu, 2008; Spears and Weiss, 2008; Sordillo and Aitken, 2009; Ingvartsen and Moyes, 2013; Lee, Priatno et al., 2019). Иммунологические и метаболические сбои у коров в период лактации, а также некоторые практики кормления телят могут иметь следствием ухудшение нутрициологического статуса и надежности иммунной защиты у новорожденных телят (*рис. 3*).

## Ныне доступные вакцины и их эффективность

Вакцинация является критически важным инструментом поддержания здоровья животных в мясных и молочных хозяйствах. Разработка эффективных программ вакцинации требует

углубленных познаний в том, что касается циркулирующих патогенов, характерного для них патогенеза, иммунного ответа у КРС, подбора оптимального времени вакцинации с учетом таких факторов, как возраст, состояние здоровья, репродуктивный статус и наличие внешних стрессовых факторов.

Настоятельно рекомендуется иммунизация животных против респираторных патогенов живыми модифицированными вакцинами против вирусных заболеваний сразу же по прибытии их в откормочное хозяйство, однако свежие данные указывают на то, что такой подход может не быть оптимальным (Richeson, Hughes et al., 2019). Связано это со стрессом, которому подвергаются животные во время транспортировки, из-за чего возрастает уровень кортизола и других провоспалительных факторов, которые могут негативно сказаться на эффективности вакцинации. Таким образом, вакцинировать животных могло бы быть предпочтительнее перед перевозкой, однако могут потребоваться дополнительные исследования, чтобы однозначно это подтвердить.

Помимо этого, несмотря на то, что польза для выживаемости и состояния здоровья телят при вакцинации коров достоверно продемонстрирована (Saif and Smith, 1985; Saif and Fernandez, 1996; Hodgins, Chattha et al., 2015), для коров не установлен оптимальный срок стельности для проведения иммунизации. Недавние исследования, проведенные на супоросных свиноматках, показали, что вакцинация против эпизоотической диареи свиней во втором триместре (но не в первом или третьем) обеспечивала оптимальный уровень иммунного ответа и состояние здоровья/выживаемость у свиноматок и их потомства (Langel, Paim et al., 2019).

В последние несколько десятилетий предпринимались значительные уси-

ления, чтобы оценить эффективность вакцинации КРС против туберкулеза препаратом для человека *Bacille Calmette-Guérin* (BCG, *Mycobacterium bovis*), и результаты выглядят многообещающе (Buddle, 2001; Buddle, Wedlock et al., 2011; Nugent, Yockney et al., 2017). Варьировались результаты метаанализа эффективности вакцинации КРС коммерческими вакцинами против респираторных заболеваний для снижения заболеваемости и смертности (Theurer, Larson et al., 2015). В то время как вакцины против герпесвируса 1 и вируса диареи КРС снижали риски, связанные с комплексом респираторных заболеваний КРС, испытания не выявили различий между животными, иммунизированными против респираторно-синцитиального вируса и парагриппа-3 КРС и контрольными животными в том, что касается снижения заболеваемости и смертности (Theurer, Larson et al., 2015).

Несмотря на то, что на рынке доступно множество лицензированных вакцин и лечебно-профилактических препаратов для КРС (табл. 4), сведений об эффективности существующих вакцинных препаратов в различных производственных условиях на удивление мало. Таким образом, большинство вакцин, хоть и демонстрирует ту или иную степень эффективности, требует оптимизации. Необходимо и более глубинное понимание иммунных процессов у КРС и состояния здоровья животных для разных возрастных групп. Не установлены и оптимальные сроки вакцинации стельных коров. Для некоторых вакцин по-прежнему получено слишком мало данных. В перспективе необходимо прийти к детальному пониманию молекулярных механизмов, используемых каждым патогеном (включая описанные выше механизмы иммуносупрессии), и факторов окружающей среды.

**Таблица 4. Лицензированные Министерством сельского хозяйства США вакцины и лечебно-профилактические препараты против заболеваний вирусной и бактериальной этиологии**

Вакцина/тип	Производители, имеющие лицензию	Эффективность
Аутогенная вакцина, убитый вирус, аутогенный бактерин	SolidTech Animal Health	
Аутогенная вакцина — аутогенный бактерин	Biomune Company, Cambridge Technologies, Colorado Serum Company, Elanco US, Hennessy Research Associates, Huvepharma, Kennebec River Biosciences, Newport Laboratories, Phibro Animal Health, Texas Vet Lab	Варьируется (Chase, 2004)
Герпесвирус КРС 1 — живая вакцина; бактерин-токсоид <i>H. somnus</i> , <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> , <i>S. typhimurium</i>	Texas Vet Lab	
Герпесвирус КРС 1 — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> (Hardjo-Pomona)	Boehringer Ingelheim Vetmedica	
Герпесвирус КРС 1 — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> (Pomona)	Diamond Animal Health	
Герпесвирус КРС 1, вирус диареи — живая вакцина; бактерин <i>Campylobacter fetus</i> , <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Zoetis	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3 — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Colorado Serum Company, Diamond Animal Health	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>C. fetus</i> , <i>H. somnus</i> , <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Elanco US	Варьируется (Theurer, Larson et al., 2015)
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>C. fetus</i> , <i>H. somnus</i> , <i>L. interrogans</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US, Intervet, Zoetis	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагрипп-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>H. somnus</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica	
Герпесвирус КРС 1, вирус диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>H. somnus</i> , <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US	

продолжение таблицы

Вакцина/тип	Производители, имеющие лицензию	Эффективность
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Diamond Animal Health, Elanco US, Intervet, Zoetis	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> ) — <i>M. haemolytica</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> hardjo	Zoetis	Варьируется (Theurer, Larson et al., 2015)
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>M. haemolytica</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; анатоксин <i>M. haemolytica</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Zoetis	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин-токсOID <i>M. haemolytica-P. multocida</i>	Diamond Animal Health	
Герпесвирус КРС 1, вирусы диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус — живая вакцина; бактерин <i>L. interrogans</i> pomona	Diamond Animal Health	
Ротавирус, коронавирус — убитая вакцина; бактерин-токсOID <i>C. perfringens</i> типа C, <i>E. coli</i>	Elanco US, Zoetis	Низкая (Waltner-Toews, Martin et al., 1985)
Ротавирус, коронавирус — убитая вакцина; бактерин-токсOID <i>C. perfringens</i> типов C и D, <i>E. coli</i>	Intervet	
Ротавирус, коронавирус — убитая вакцина; бактерин <i>E. coli</i>	Zoetis	
Живая вакцина против вирусной диареи; бактерин <i>C. fetus</i> , <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Zoetis	Высокая (Newcomer, Chamorro et al., 2017; Walz, Riddell et al., 2018)
Живая вакцина против вирусной диареи; бактерин <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Zoetis	
Живая вакцина против вирусной диареи; анатоксин <i>M. haemolytica</i>	Zoetis	

продолжение таблицы

Вакцина/тип	Производители, имеющие лицензию	Эффективность
Вакцина против <i>Trichomonas foetus</i> , убитые простейшие; бактерин <i>C. fetus</i> , <i>L. interrogans</i> ( <i>canicola-grippotyphosa-hardjo-icterohaemorrhagiae-pomona</i> )	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US	
Бактерин-токсOID <i>C. botulinum</i> типа C	United Vaccines	Варьируется (Lalsiamthara and Lee, 2017)
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-haemolyticum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Intervet, Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-haemolyticum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D, <i>H. somnus</i>	Intervet	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-haemolyticum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D, <i>M. haemolytica</i>	Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-haemolyticum-novyi-sordellii-tetani-perfringens</i> типов C и D	Intervet	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-haemolyticum-novyi-tetani-perfringens</i> типов C и D	Intervet	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-novyi</i>	Colorado Serum Company	От низкой до умеренной (Uzal, 2012)
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-novyi-sordellii</i>	Colorado Serum Company	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US, Intervet, Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D, <i>H. somnus</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Intervet, Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D, <i>M. haemolytica</i>	Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>C. chauvoei-septicum-novyi-sordellii-perfringens</i> типов C и D, <i>Moraxella bovis</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Intervet	
Бактерин-токсOID <i>C. perfringens</i> типа C, <i>E. coli</i>	Elanco US, Intervet, Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>C. perfringens</i> типов C и D	Elanco US, Intervet, Zoetis	Высокая (Zaragoza, Orellana et al., 2019)
Бактерин-токсOID <i>C. perfringens</i> типов C и D, <i>C. tetani</i>	Intervet	
Бактерин-токсOID <i>C. tetani-perfringens</i> типа D, <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Colorado Serum Company	

продолжение таблицы

Вакцина/тип	Производители, имеющие лицензию	Эффективность
Бактерин-токсOID <i>C. pseudotuberculosis</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Colorado Serum Company	Высокая (Moussa, Ali et al., 2016)
Бактерин-токсOID <i>E. coli</i>	Merial	Варьируется (Ismail, 2017)
Бактерин-токсOID <i>H. somnus</i> , <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i>	Texas Vet Lab	Варьируется
Бактерин-токсOID <i>H. somnus</i> , <i>M. haemolytica</i> — <i>P. multocida</i> , <i>S. typhimurium</i>	Texas Vet Lab	Варьируется
Бактериальный экстракт-анатоксин <i>M. haemolytica</i>	Elanco US	Умеренная (Ayalew, Confer et al., 2013; Nagai, Otomaru et al., 2019)
Бактерин-токсOID <i>M. haemolytica</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Elanco US, Zoetis	
Бактерин-токсOID <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i>	American Animal Health, Merial	
Бактериальный экстракт <i>P. multocida</i> -анатоксин <i>M. haemolytica</i>	Boehringer Ingelheim Vetmedica	Высокая (Nagai, Otomaru et al., 2019)
Бактерин-токсOID <i>S. typhimurium</i>	Immvac	Низкая (Foster, Jacob et al., 2019)
Бактерин-токсOID <i>S. aureus</i>	Hygieia Biological Laboratories	Варьируется (Ismail, 2017)
Анатоксин <i>C. botulinum</i> типа В	Neogen	Варьируется (Lalsiamthara and Lee, 2017)
Анатоксин <i>C. perfringens</i> типа А	Elanco US, Intervet	Высокая (Zaragoza, Orellana et al., 2019)
Анатоксин <i>C. perfringens</i> типа С	Colorado Serum Company	
Анатоксин <i>C. perfringens</i> типа D	Colorado Serum Company	
<i>C. perfringens</i> типа D-столбнячный анатоксин	Colorado Serum Company	
Анатоксин <i>C. perfringens</i> типов С и D	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Colorado Serum Company	
<i>C. perfringens</i> типы С и D-столбнячный анатоксин	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Colorado Serum Company	
Столбнячный анатоксин	Boehringer Ingelheim Vetmedica, Colorado Serum Company, Intervet, Zoetis, Merck, Santa Cruz Animal Health	Высокая (Zaragoza, Orellana et al., 2019)

## Антимикробная и вспомогательная терапия для КРС

Антимикробные препараты чаще всего используются для лечения у КРС диареи и респираторных заболеваний (Constable, 2009; Fulton, 2009). Поскольку в развитии респираторных симптомов обычно участвуют бактерии различных видов, то лечение заключается в эмпирической антибиотикотерапии с применением широкого спектра классов веществ — чаще всего среди них пенициллины, тетрациклические, макролиды и хинолоны (De Briyne, Atkinson et al., 2014).

Несмотря на то, что лишь у небольшого числа животных могут быть клинические признаки, лечение обычно получает все поголовье для более эффективной борьбы с патогенами и более высокой выживаемости животных (Nickell and White, 2010). Однако такой метафилактический подход таит в себе риск контаминации пищевой цепи и окружающей среды факторами антибиотикорезистентности (бактерии и отдельные гены) (Lhermie, Toutain et al., 2017).

Своевременная диагностика и лечение болезней животных позволяет существенно снизить требуемые дозы противомикробных препаратов, тем самым минимизируя риски, связанные с антибиотикорезистентностью; однако методы и инструменты надежного обнаружения инфекционных агентов на ранних стадиях пока не разработаны (Lhermie, Toutain et al., 2017). Тем не менее в настоящий момент доступна персонализированная медицина для людей и домашних питомцев, и есть основания надеяться, что соответствующие технологии будут имплементированы и в индустриальном животноводстве.

Для лечения энтерита, вызванного *E. coli*, Министерство сельского хозяйст-

ва США одобрило применение окситетрациклина и сульфахлорпиридиазина парентерально, а также амоксициллина, хлортетрациклина, неомицина, окситетрациклина, стрептомицина, сульфахлорпиридиазина, сульфаметазина и тетрациклина перорально, но доказательств эффективности этих веществ практически нет (Constable, 2009). Все еще предстоит разработать оптимальные схемы лечения и при криптоспоридиозе, хотя свежие данные указывают на то, что эффективны могут быть галофугинон, азитромицин и лазалоцид (Lhermie, Toutain et al., 2017).

Известно, что у здоровых телят, получавших пенициллин, хлорамфеникол и неомицин, наблюдались симптомы диареи, снижение темпов роста и нарушение всасывания в кишечнике (Constable, 2009), и в сочетании с опасениями, связанными с антибиотикорезистентностью, такие данные указывают на необходимость ответственного использования антимикробных препаратов во избежание последствий для здоровья животных или человека (Morley, Apley et al., 2005). Эти соображения и отсутствие эффективных вакцин против большинства значимых патогенов КРС подтолкнули исследователей на поиски инструментов вспомогательной терапии и комплексных подходов к поддержанию здоровья животных.

Вспомогательное лечение, имеющее целью минимизацию ущерба от патогенов и укрепление неспецифической резистентности, заключается в оптимизации рациона и введении в него микронутриентов (нутрицевтики), обеспечении достаточных количеств молозива и молока и их получения телятами с симптомами диареи в малых дозах для оптимального усвоения, применении анальгетиков и противовоспалительных препаратов (в том числе мелоксикама и нестероидных агентов) для облегчения

симптомов воспаления, пробиотиков и пребиотиков, а также пассивной иммунотерапии.

Все больше доказательств того, что поврежденный кишечник нуждается в иммунных и метаболических/ростовых факторах в свежем коровьем молоке для оптимизации процесса регенерации тканей. В свете этого хорошо себя показало одновременное выпаивание молоком и оральная регидратационная терапия по сравнению со случаями использования только последней (Constable, 2009).

Недавно оценивали эффективность еще одного активно разрабатывающегося подхода, который заключается в аэрозольном распылении вакцины BCG для стимуляции компонентов системы врожденного иммунитета, обладающих механизмами, похожими на память (т.е. «тренировка» неспецифического иммунитета). Эта иммунологическая стратегия позволила облегчить симптомы среди молодых животных в период, когда их система адаптивного иммунитета еще не успела сформироваться (Guerra-Maupome, Vang et al., 2019).

Несмотря на то, что пробиотики не рекомендуют в качестве инструмента лечения инфекций, их можно использовать (в составе корма или отдельно) для повышения продуктивности животных и снижения восприимчивости к кишечным патогенам (Vlasova, Kandasamy et al., 2016). Сведений об эффективности добавок на основе пребиотиков мало и они зачастую противоречивы. Молочнокислые бактерии либо *Lactobacillus rhamnosus* GG не обеспечивали облегчения симптомов диареи, соответственно вызываемой *C. parvum*, или диареи любой этиологии (Nagp, Jardon et al., 1996; Weese and Rousseau, 2005); с другой стороны, среди телят, получавших *E. coli* Nissle 1917 в течение

первых 10–12 дней жизни животных, страдавших от диареи становилось значительно меньше (von Buenau, Jaekel et al., 2005).

Эффективно защищали телят от некоторых патогенов (в числе которых были ротавирус, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, энтероротоксигенная *E. coli* и сальмонеллы) антитела класса IgY из куриного желтка, полученного из яиц птиц, иммунизированных против тех или иных инфекционных агентов (Mine and Kovacs-Nolan, 2002; Vega, Bok et al., 2015; Abbas, El-Kafrawy et al., 2019). На рынке доступно несколько препаратов для телят на основе IgY. Также интересно, что комплексный подход, включающий использование пре- и пробиотиков в сочетании с антителами класса IgY, успешно применялся для снижения тяжести симптомов диареи у голштинских телят. Добавка на основе *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus faecium* и *Bifidobacterium longum*, пребиотиков (RFC-MOS, FOS), угля и сушеного яичного белка от кур, гипериммунизированных антигенами *E. coli* K99+, *S. enterica* сероваров *Typhimurium* и *Dublin*, коронавирусом и ротавирусом КРС, снижала заболеваемость диареей среди телят в течение первых трех недель жизни (25,0% против 51,1% в контрольной группе) (Ballou, 2011).

Также применяются такие методы поддерживающей терапии, как поддержание низкого pH в сычуге для снижения численности патогенных бактерий (таких как сальмонеллы), применение пищевых добавок на основе короткоцепочечных жирных кислот (уксусной и пропионовой) для ингибирования роста патогенных бактерий, фитотерапия (препараты на основе таких растений, как ноголист или орегано), использование «протектантов» и «абсорбентов»

(таких как каолин, активированный аттапульгит, активированный уголь и пектин), введение агентов, снижающих подвижность кишечника (гиосцина N-бутилбромид или атропин). Между тем клиническая эффективность остается низкой и требует более подробной оценки (Constable, 2009). Сходным образом парентеральное введение экстрактов клеточных стенок микробактерий (Muscato, Tedeschi et al., 2002) в какой-то степени повышало эффективность лечения диареи у телят, но масштабных испытаний данного подхода не проводилось.

## Заключительные замечания

В настоящее время мы не имеем возможности обеспечивать оптимальное состояние здоровья КРС в связи с тем, что не обладаем достаточными фундаментальными познаниями о функционировании иммунной системы у этого вида животных и не имеем последовательно разработанного инструментария. Особенно это ощущается, когда речь идет о новорожденных телятах с их не зрелой иммунной системой, и молочных коровах в переходный период, страдающих от иммунных и метаболических сбоев. Крайне необходимы масштабные испытания и оптимизация существующих вакцин в полевых условиях.

Скорее всего, новые инструменты и решения для борьбы с инфекционными и воспалительными заболеваниями у КРС появятся в ходе углубленного изучения влияния на иммунную систему животных макро- и микронутриентов, а также комменсальных и пробиотических бактерий. Имеющиеся данные говорят в пользу важности обеспечения молозивом и молоком в достаточных количествах в течение первой недели жизни и оптимизации рациона живот-

ных в зависимости от возрастной и производственной категории, чтобы стимулировать формирование иммунной системы и поддерживать ее в надлежащем состоянии.

Рутинная иммунизация телят, телок и стельных коров против заболеваний, вакцинопрофилактика которых возможна, а также элиминация патогенов, нарушающих работу иммунной системы, являются критически важными стратегиями для поддержания здоровья поголовья в целом. Кроме того, необходимы исследования для установления оптимального времени вакцинации и использования инновационных вакцин и вспомогательных веществ (микронутриенты, пробиотики и др.) — это позволит создавать улучшенные вакцины и схемы вакцинации (например, принимая во внимание стресс животных при транспортировке) для обеспечения более высокого уровня защиты при помощи уже существующих или новых препаратов. Наконец, комплексная стратегия, объединяющая вышеописанные инструменты вспомогательной терапии (такие как про- и пребиотики, антитела класса IgY, контроль pH в сычуге и сохранение целостности эпителия) вкупе с минимизацией использования антибиотиков положительно скажется на молочном и мясном животноводстве как секторе промышленности в целом.

## Литература

1. Abbas A.T., S.A. El-Kafrawy, S.S. Sohrab and E.I.A. Azhar. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(1): 264–275.
2. Abrahamsen M.S. Bovine T cell responses to *Cryptosporidium parvum* infection. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28(7): 1083–1088.

3. Ackermann M.R., R. Derscheid and J.A. Roth. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 215–228.
4. Aditya S., E. Humer, P. Pourazad, R. Khiaosa-Ard, J. Huber and Q. Zebeli. Intramammary infusion of *Escherichia coli* lipopolysaccharide negatively affects feed intake, chewing, and clinical variables, but some effects are stronger in cows experiencing subacute rumen acidosis. *J. Dairy. Sci.* 2017; 100(2): 1363–1377.
5. Al Naib A., S. Mamo, G.M. O’Gorman, P. Lonergan, A. Swales and T. Fair. Regulation of non-classical major histocompatibility complex class I mRNA expression in bovine embryos. *J. Reprod. Immunol.* 2011; 91(1–2): 31–40.
6. Andrieu S. Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? *Vet. J.* 2008; 176(1): 77–83.
7. Arzt J., B. Baxt, M.J. Grubman, T. Jackson, N. Juleff, J. Rhyan, E. Rieder, R. Waters and L.L. Rodriguez. The pathogenesis of foot-and-mouth disease II: viral pathways in swine, small ruminants, and wildlife; myotropism, chronic syndromes, and molecular virus-host interactions. *Transbound. Emerg. Dis.* 2011; 58(4): 305–326.
8. Ayalew S., A.W. Confer, B. Shrestha, A.E. Wilson and M. Montelongo. Proteomic analysis and immunogenicity of *Mannheimia haemolytica* vesicles. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2): 191–196.
9. Ballou M.A. CASE STUDY: Effects of a blend of prebiotics, probiotics, and hyperimmune dried egg protein on the performance, health, and innate immune responses of Holstein calves. *Prof. Anim. Sci.* 2011; 27(3): 262–268.
10. Bannerman D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2009; 87(13 Suppl): 10–25.
11. Barrington G.M., T.E. Besser, W.C. Davis, C.C. Gay, J.J. Reeves and T.B. McFadden. Expression of immunoglobulin G1 receptors by bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes. *J. Dairy Sci.* 1997; 80(1): 86–93.
12. Barrington G.M. and S.M. Parish. Bovine neonatal immunology. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2001; 17(3): 463–476.
13. Benedictus L., A.J. Thomas, R. Jorritsma, C.J. Davies and A.P. Koets. Two-way calf to dam major histocompatibility class I compatibility increases risk for retained placenta in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012; 67(3): 224–230.
14. Bertics S.J., R.R. Grummer, C. Cadorniga-Valino and E.E. Stoddard. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J. Dairy Sci.* 1992; 75(7): 1914–1922.
15. Borghesi L. and C. Milcarek. Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime?» *Cancer. Res.* 2007; 67(9): 3989–3993.
16. Brandtzaeg P. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183(12): 1595–1604.
17. Brandtzaeg P., H. Kiyono, R. Pabst and M.W. Russell. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 2008; 1(1): 31–37.
18. Brown W.C., A.C. Rice-Ficht and D.M. Estes. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998; 63(1–2): 45–55.
19. Brulc J.M., D.A. Antonopoulos, M.E. Miller, M.K. Wilson, A.C. Yannarell, E.A. Dinsdale, R.E. Edwards, E.D. Frank, J.B. Emerson, P. Wacklin, P.M. Coutinho, B. Henrissat, K.E. Nelson and B.A. White. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(6): 1948–1953.
20. Buddle B.M. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2001; 81(1–2): 125–132.

21. Buddle B.M., D.N. Wedlock, M. Denis, H.M. Vordermeier and R.G. Hewinson. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 2011; 151(1–2): 14–22.
22. Butler J.E., Y. Zhao, M. Sinkora, N. Wertz and I. Kacskovics. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev. Comp. Immunol.* 2009; 33(3): 321–333.
23. Chamorro M.F., N. Cernicchiaro and D.M. Haines. Evaluation of the effects of colostrum replacer supplementation of the milk replacer ration on the occurrence of disease, antibiotic therapy, and performance of pre-weaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2017; 100(2): 1378–1387.
24. Chase C. and R.S. Kaushik. Mucosal Immune System of Cattle: All Immune Responses Begin Here. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2019; 35(3): 431–451.
25. Chase C.C. Autogenous vaccines: current use in the field in the U.S. cattle and hog industry. *Dev. Biol. (Basel)*. 2004; 117: 69–71.
26. Chase C.C., D.J. Hurley and A.J. Reber. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2008; 24(1): 87–104.
27. Chase C.C.L. Enteric Immunity: Happy Gut, Healthy Animal. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2018; 34(1): 1–18.
28. Connelley T., N.D. MacHugh, A. Burrells and W.I. Morrison. Dissection of the clonal composition of bovine alpha-beta T cell responses using T cell receptor Vbeta subfamily-specific PCR and heteroduplex analysis. *J. Immunol. Methods*. 2008; 335(1–2): 28–40.
29. Constable P.D. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2009; 25(1): 101–120, vi.
30. Cunha P., Y.L. Vern, C. Gitton, P. Germon, G. Foucras and P. Rainard. Expansion, isolation and first characteriza-
- tion of bovine Th17 lymphocytes. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 16115.
31. Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J. Clin. Immunol.* 2001; 21(5): 303–309.
32. De Briyne N., J. Atkinson, L. Pokludova and S.P. Borriello. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec.* 2014; 175(13): 325.
33. Derakhshani H., J. De Buck, R. Mortier, H.W. Barkema, D.O. Krause and E. Khafipour. The Features of Fecal and Illeal Mucosa-Associated Microbiota in Dairy Calves during Early Infection with *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 426.
34. Endsley J.J., J.A. Roth, J. Ridpath and J. Neill. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*. 2003; 31(2): 123–125.
35. Enss M.L., H. Grosse-Siestrup, U. Schmidt-Wittig and K. Gartner. Changes in colonic mucins of germfree rats in response to the introduction of a “normal” rat microbial flora. Rat colonic mucin. *J. Exp. Anim. Sci.* 1992; 35(3): 110–119.
36. Eschbaumer M., C. Stenfeldt, S.I. Rekant, J.M. Pacheco, E.J. Hartwig, G.R. Smoliga, M.A. Kenney, W.T. Golde, L.L. Rodriguez and J. Arzt. Systemic immune response and virus persistence after foot-and-mouth disease virus infection of naive cattle and cattle vaccinated with a homologous adenovirus-vectored vaccine. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 205.
37. Ezzat Alnakip M., M. Quintela-Baluja, K. Bohme, I. Fernandez-No, S. Caamaño-Antelo, P. Calo-Mata and J. Barros-Velazquez. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J. Vet. Med.* 2014; 659801.
38. Ferluga J., H. Yasmin, M.N. Al-Ahdal, S. Bhakta and U. Kishore. Natural and trained innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*. 2020; 225(3): 151951.

39. Foster D., M. Jacob, D. Stowe and G. Smith. Exploratory cohort study to determine if dry cow vaccination with a *Salmonella* Newport bacterin can protect dairy calves against oral *Salmonella* challenge. *J. Vet. Intern. Med.* 2019; 33(4): 1796–1806.
40. Fulton R.W. Bovine respiratory disease research (1983–2009). *Anim. Health. Res. Rev.* 2009; 10(2): 131–139.
41. Fulton R.W., H.R. Herd, N.J. Sorensen, A.W. Confer, J.W. Ritchey, J.F. Ridpath and L.J. Burge. Enteric disease in post-weaned beef calves associated with Bovine coronavirus clade 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2015; 27(1): 97–101.
42. Goldammer T., H. Zerbe, A. Molenaar, H.J. Schuberth, R.M. Brunner, S.R. Kata and H.M. Seyfert. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11(1): 174–185.
43. Gomez D.E., L.G. Arroyo, M.C. Costa, L. Viel and J.S. Weese. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *J. Vet. Intern. Med.* 2017; 31(3): 928–939.
44. Gomez D.E., K.N. Galvao, J.C. Rodriguez-Lecompte and M.C. Costa. The Cattle Microbiota and the Immune System: An Evolving Field. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2019; 35(3): 485–505.
45. Guerra-Maupome M., D.X. Vang and J.L. McGill. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PLoS One.* 2019; 14(2): e0212751.
46. Gulbe G., M. Pilmane, V. Saulite, S. Donina, J. Jermolajevs, L. Peskova and A. Valdovska. Cells and Cytokines in Milk of Subclinically Infected Bovine Mammary Glands after the Use of Immunomodulatory Composition GLP 810. *Mediators Inflamm.* 2020; 8238029.
47. Harp J.A., P. Jardon, E.R. Atwill, M. Zylstra, S. Checel, J.P. Goff and C. De Simone. Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. *Am. J. Vet. Res.* 1996; 57(11): 1586–1588.
48. Haubold S., C. Kroger-Koch, A. Starke, A. Tuchscherer, A. Troscher, H. Kienberger, M. Rychlik, U. Bernabucci, E. Trevisi and H.M. Hammon. Effects of abomasal infusion of essential fatty acids and conjugated linoleic acid on performance and fatty acid, antioxidative, and inflammatory status in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2020; 103(1): 972–991.
49. Heuer C., Y.H. Schukken and P. Dobbelaar. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 1999; 82(2): 295–304.
50. Heyland D.K., R. Dhaliwal, A.G. Day, J. Muscedere, J. Drover, U. Suchner, D. Cook and G. Canadian Critical Care Trials. REDucing Deaths due to OXidative Stress (The REDOX Study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients. *Proc. Nutr. Soc.* 2006; 65(3): 250–263.
51. Hodgins D.C., K.S. Chattha, A.N. Vlasova, V. Parreno, L.B. Corbeil, G.J. Renukaradhy and L.J. Saif. *Mucosal Veterinary Vaccines: Comparative Vaccinology. Mucosal Immunology.* J. Mestecky, M.E. Lamm, J.R. McGhee et al. Atlanta, GA, Academic Press, Elsevier: 2015; 1337–1361.
52. Holschbach C.L. and S.F. Peek. *Salmonella* in Dairy Cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2018; 34(1): 133–154.
53. Hungate R.E. CHAPTER VII — Conversions of Nitrogenous Materials. The rumen and its microbes. Academic Press: 1966; 281–330.
54. Ikebuchi R., S. Konnai, T. Shirai, Y. Sundén, S. Murata, M. Onuma and K. Ohashi. Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus in-

- fection and enhancement of anti-viral immune responses *in vitro* via PD-L1 blockade. *Vet. Res.* 2011; 42: 103.
55. Ingvarsson K.L. and K. Moyes. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*. 2013; 7(Suppl 1): 112–122.
  56. Inman C.F., K. Haverson, S.R. Konstantinov, P.H. Jones, C. Harris, H. Smidt, B. Miller, M. Bailey and C. Stokes. Rearing environment affects development of the immune system in neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 160(3): 431–439.
  57. Ismail Z.B. Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Vet. World*. 2017; 10(9): 1057–1062.
  58. Kessler E.C., R.M. Bruckmaier and J.J. Gross. Colostrum composition and immunoglobulin G content in dairy and dual-purpose cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 2020; 98(8).
  59. Kim D., S.A. Yoo and W.U. Kim. Gut microbiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Arch. Pharm. Res.* 2016; 39(11): 1565–1576.
  60. Kimman T.G., F. Westenbrink, B.E. Schreuder and P.J. Straver. Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(6): 1097–1106.
  61. Ko A.I., C. Goarant and M. Picardeau. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7(10): 736–747.
  62. Konnai S., S. Murata and K. Ohashi. Immune exhaustion during chronic infections in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2017; 79(1): 1–5.
  63. Korhonen H., P. Marnila and H.S. Gill. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br. J. Nutr.* 2000; 84(Suppl 1): S 75–80.
  64. Lalsiamthara J. and J.H. Lee. Development and trial of vaccines against Brucella. *J. Vet. Sci.* 2017; 18(S1): 281–290.
  65. Langel S.N., F.C. Paim, M.A. Alhamo, A. Buckley, A. Van Geelen, K.M. Lager, A.N. Vlasova and L.J. Saif. Stage of Gestation at Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection of Pregnant Swine Impacts Maternal Immunity and Lactogenic Immune Protection of Neonatal Suckling Piglets. *Front. Immunol.* 2019; 10: 727.
  66. Larson B.L., H.L. Heary, Jr. and J.E. Devery. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1980; 63(4): 665–671.
  67. Lee J., J.H. Mo, K. Katakura, I. Alkalay, A.N. Rucker, Y.T. Liu, H.K. Lee, C. Shen, G. Cojocaru, S. Shenouda, M. Kagnoff, L. Eckmann, Y. Ben-Neriah and E. Raz. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8(12): 1327–1336.
  68. Lee J.S., W. Priatno, J. Ghassemi Nejad, D.Q. Peng, J.S. Park, J.O. Moon and H.G. Lee. Effect of dietary rumen-protected L-tryptophan supplementation on growth performance, blood hematological and biochemical profiles, and gene expression in Korean native steers under cold environment. *Animals (Basel)*. 2019; 9(12).
  69. Leite F.L., L.B. Eslabao, B. Pesch, J.P. Bannantine, T.A. Reinhardt and J.R. Stabel. ZAP-70, CTLA-4 and proximal T cell receptor signaling in cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 167(1–2): 15–21.
  70. Leitner G., B. Yadlin, A. Glickman, M. Chaffer and A. Saran. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 2000; 69(2): 181–184.
  71. Lettat A. and C. Benchaar. Diet-induced alterations in total and metabolically active microbes within the rumen of dairy cows. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60978.

72. Levings R.L. and J.A. Roth. Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral life-cycle and innate immunity. *Anim. Health. Res. Rev.* 2013; 14(1): 88–102.
73. Lhermie G., P.L. Toutain, F. El Garch, A. Bousquet-Melou and S. Assie. Implementing precision antimicrobial therapy for the treatment of bovine respiratory disease: current limitations and perspectives. *Front. Vet. Sci.* 2017; 4: 143.
74. Liebler-Tenorio E.M., G. Riedel-Caspari and J.F. Pohlenz. Uptake of colostral leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 85(1–2): 33–40.
75. Mackie R.I., A. Sghir and H.R. Gaskins. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69(5): 1035S–1045S.
76. Maeda Y., H. Ohtsuka, M. Tomioka and M. Oikawa. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Vet. Res. Commun.* 2013; 37(1): 43–49.
77. Malmuthuge N., M. Li, P. Fries, P.J. Griebel and L.L. Guan. Regional and age dependent changes in gene expression of Toll-like receptors and key antimicrobial defence molecules throughout the gastrointestinal tract of dairy calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012; 146(1): 18–26.
78. Malmuthuge N., M. Li, L.A. Goonetwardene, M. Oba and L.L. Guan. Effect of calf starter feeding on gut microbial diversity and expression of genes involved in host immune responses and tight junctions in dairy calves during weaning transition. *J. Dairy. Sci.* 2013; 96(5): 3189–3200.
79. Mansouri-Attia N., L.J. Oliveira, N. Forde, A.G. Fahey, J.A. Browne, J.F. Roche, O. Sandra, P. Reinaud, P. Lonergan and T. Fair. Pivotal role for monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the developing embryo in cattle. *Biol. Reprod.* 2012; 87(5): 123.
80. Matthews C., F. Crispie, E. Lewis, M. Reid, P.W. O'Toole and P.D. Cotter. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut. Microbes.* 2019; 10(2): 115–132.
81. Maunsell F.P. and C. Chase. *Mycoplasma bovis: Interactions with the Immune System and Failure to Generate an Effective Immune Response.* *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2019; 35(3): 471–483.
82. McClenahan D.J., J.P. Sotos and C.J. Czuprynski. Cytokine response of bovine mammary gland epithelial cells to *Escherichia coli*, coliform culture filtrate, or lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 2005; 66(9): 1590–1597.
83. McDaniel C.J., D.M. Cardwell, R.B. Moeller, Jr. and G.C. Gray. Humans and cattle: a review of bovine zoonoses. *Vector. Zoonotic. Dis.* 2014; 14(1): 1–19.
84. McGill J.L. and R.E. Sacco. The immunology of bovine respiratory disease: recent advancements. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2020; 36(2): 333–348.
85. Meade K.G. Advances in bovine immunology — new tools and new insights to tackle old foes. *Front. Immunol.* 2015; 6: 71.
86. Mine Y. and J. Kovacs-Nolan. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food.* 2002; 5(3): 159–169.
87. Morley P.S., M.D. Apley, T.E. Besser, D.P. Burney, P.J. Fedorka-Cray, M.G. Papich, J.L. Traub-Dargatz, J.S. Weese and M. American College of Veterinary Internal. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. *J. Vet. Intern. Med.* 2005; 19(4): 617–629.
88. Morrison L.A., A.E. Lukacher, V.L. Braciale, D.P. Fan and T.J. Braciale. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 1986; 163(4): 903–921.

89. Mosmann T.R. and R.L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7: 145–173.
90. Moussa I.M., M.S. Ali, A.M. Hessain, S.A. Kabli, H.A. Hemeg and S.A. Selim. Vaccination against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections controlling caseous lymphadenitis (CLA) and oedematous skin disease. *Saudi. J. Biol. Sci.* 2016; 23(6): 718–723.
91. Muscato T.V., L.O. Tedeschi and J.B. Russell. The effect of ruminal fluid preparations on the growth and health of newborn, milk-fed dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2002; 85(3): 648–656.
92. Nagai K., K. Otomaru, R. Ogawa, S. Oishi, K. Wataya, Y. Honkawa, Y. Iwamoto, T. Ando, K. Hyakutake, H. Shirahama, G. Habiby and C. Kubota. Effect of combined vaccination for *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Hophilus somni* to prevent respiratory diseases in young Japanese Black calves in the field. *J. Vet. Med. Sci.* 2019; 81(9): 1355–1358.
93. Neefjes J., M.L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11(12): 823–836.
94. Nene V., N. Svitek, P. Toye, W.T. Golde, J. Barlow, M. Harndahl, S. Buus and M. Nielsen. Designing bovine T cell vaccines via reverse immunology. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 2012; 3(3): 188–192.
95. Newcomer B.W., M.F. Chamorro and P.H. Walz. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 78–83.
96. Nickell J.S. and B.J. White. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 285–301.
97. Niemiałtowski M., A. Schollenberger and W. Kluciński. Mucosal immunoity and the bovine entero-mammary link: evolutionary established dialogue between antigen and arms of immune system. *Microbial Ecology of Growing Animals*. W.H. Holzapfel, P.J. Naughton, S.G. Pierzynowski, R. Zabielski and E. Salek. Elsevier. 2005; 2: 293–313.
98. Novak K. Functional polymorphisms in Toll-like receptor genes for innate immunity in farm animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2014; 157(1–2): 1–11.
99. Nugent G., I.J. Yockney, J. Whitford, F.E. Aldwell and B.M. Buddle. Efficacy of oral BCG vaccination in protecting free-ranging cattle from natural infection by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 2017; 208: 181–189.
100. O’Gorman G.M., A. Al Naib, S.A. Ellis, S. Mamo, A.M. O’Doherty, P. Lonergan and T. Fair. Regulation of a bovine nonclassical major histocompatibility complex class I gene promoter. *Biol. Reprod.* 2010; 83(2): 296–306.
101. Ohira K., A. Nakahara, S. Konnai, T. Okagawa, A. Nishimori, N. Maekawa, R. Ikebuchi, J. Kohara, S. Murata and K. Ohashi. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF-beta secretion from regulatory T cells. *Immun. Inflamm. Dis.* 2016; 4(1): 52–63.
102. Oikonomou G., A.G. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado and R.C. Bicalho. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. *PLoS One.* 2013; 8(4): e63157.
103. Okagawa T., S. Konnai, J.R. Deringer, M.W. Ueti, G.A. Scoles, S. Murata, K. Ohashi and W. C. Brown. Cooperation of PD-1 and LAG-3 Contributes to T-Cell Exhaustion in *Anaplasma marginale*-Infected Cattle. *Infect. Immun.* 2016; 84(10): 2779–2790.

104. Okagawa T., S. Konnai, A. Nishimori, R. Ikebuchi, S. Mizorogi, R. Nagata, S. Kawaji, S. Tanaka, Y. Kagawa, S. Murata, Y. Mori and K. Ohashi. Bovine Immunoinhibitory Receptors Contribute to Suppression of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Specific T-Cell Responses. *Infect. Immun.* 2016; 84(1): 77–89.
105. Oliveira L.J., R.S. Barreto, F. Perecin, N. Mansouri-Attia, F.T. Pereira and F.V. Meirelles. Modulation of maternal immune system during pregnancy in the cow. *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47(Suppl 4): 384–393.
106. Oliveira L.J., S. McClellan and P.J. Hansen. Differentiation of the endometrial macrophage during pregnancy in the cow. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13213.
107. Paibomesai M.A., S. Sharif, N. Karow and B.A. Mallard. Type I and type II cytokine production of CD4+ T-cells in immune response biased dairy cattle around calving. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018; 199: 70–76.
108. Palczynski L.J., E.C.L. Bleach, M.L. Brennan and P.A. Robinson. Appropriate Dairy Calf Feeding from Birth to Weaning: “It’s an Investment for the Future”. *Animals (Basel).* 2020; 10(1).
109. Palomares R.A., D.J. Hurley, A.R. Woolums, J.E. Parrish and K.V. Brock. Analysis of mRNA expression for genes associated with regulatory T lymphocytes (CD25, FoxP3, CTLA4, and IDO) after experimental infection with bovine viral diarrhea virus of low or high virulence in beef calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 37(5–6): 331–338.
110. Peterhans E., T.W. Jungi and M. Schweizer. BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 2003; 31(2): 107–112.
111. Ploegaert T.C., E. Tijhaar, T.J. Lam, A. Taverne-Thiele, J.J. van der Poel, J.A. van Arendonk, H.F. Savelkoul and H.K. Parmentier. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: variability among cows, repeatability within cows, and relation between milk and plasma titers. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011; 144(1–2): 88–94.
112. Rainard P. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet. Res.* 2003; 34(5): 647–670.
113. Rainard P. Tackling mastitis in dairy cows. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23(4): 430–432.
114. Rainard P. and C. Riollet. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 2006; 37(3): 369–400.
115. Raphael W. and L.M. Sordillo. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: the role of phospholipid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(10): 21167–21188.
116. Richeson J.T., H.D. Hughes, P.R. Broadway and J.A. Carroll. Vaccination Management of Beef Cattle: Delayed Vaccination and Endotoxin Stacking. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2019; 35(3): 575–592.
117. Roussey J.A., J.P. Steibel and P.M. Coussens. Regulatory T Cell Activity and Signs of T Cell Unresponsiveness in Bovine Paratuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 2014; 1: 20.
118. Saif L.J. Bovine respiratory coronaviruses. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–364.
119. Saif L.J. and F.M. Fernandez. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl 1): S98–106.
120. Saif L.J. and K.L. Smith. Enteric viral infections of calves and passive immunity. *J. Dairy Sci.* 1985; 68(1): 206–228.
121. Santecchia I., F. Vernel-Pauillac, O. Rasid, J. Quintin, M. Gomes-Solecki, I.G. Boneca and C. Werts. Innate immune memory through TLR2 and NOD2 contributes to the control of *Leptospira* interrogans infection. *PLoS Pathog.* 2019; 15(5): e1007811.
122. Schaut R.G., J.L. McGill, J.D. Neill, J.F. Ridpath and R.E. Sacco. Bovine viral diarrhea virus type 2 in vivo infection

- modulates TLR4 responsiveness in differentiated myeloid cells which is associated with decreased MyD88 expression. *Virus. Res.* 2015; 208: 44–55.
123. Schaut R.G., J.F. Ridpath and R.E. Sacco. Bovine viral diarrhea virus type 2 impairs macrophage responsiveness to toll-like receptor ligation with the exception of toll-like receptor 7. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159491.
  124. Schiller I., B. Oesch, H.M. Vordermeier, M.V. Palmer, B.N. Harris, K.A. Orloski, B.M. Buddle, T.C. Thacker, K.P. Lyashchenko and W.R. Waters. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 2010; 57(4): 205–220.
  125. Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science.* 1993; 260(5107): 496–497.
  126. Shafer-Weaver K.A., G.M. Pighetti and L.M. Sordillo. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1996; 212(3): 271–280.
  127. Site B. d.-T. D. from <https://www.thedairysite.com/focus/thermo-fisher-scientific/2334/bovine-diagnostics>
  128. Smith G. Antimicrobial decision making for enteric diseases of cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2015; 31(1): 47–60.
  129. Sordillo L.M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J. Dairy Sci.* 2016; 99(6): 4967–4982.
  130. Sordillo L.M. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2018; 34(3): 507–523.
  131. Sordillo L.M. and S.L. Aitken. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 128(1–3): 104–109.
  132. Sordillo L.M. and W. Raphael. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2013; 29(2): 267–278.
  133. Spears J.W. and W.P. Weiss. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 2008; 176(1): 70–76.
  134. Stanfield R.L., J. Haakenson, T.C. Deiss, M.F. Criscitiello, I.A. Wilson and V.V. Smider. The unusual genetics and biochemistry of bovine immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 2018; 137: 135–164.
  135. Stanifer M.L., M. Mukenhirm, S. Muenchau, K. Pervolaraki, T. Kanaya, D. Albrecht, C. Odendall, T. Hielscher, V. Haucke, J.C. Kagan, S. Bartfeld, H. Ohno and S. Boulant. Asymmetric distribution of TLR3 leads to a polarized immune response in human intestinal epithelial cells. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(1): 181–191.
  136. Stilwell G. and R.C. Carvalho. Clinical outcome of calves with failure of passive transfer as diagnosed by a commercially available IgG quick test kit. *Can. Vet. J.* 2011; 52(5): 524–526.
  137. Sultana R., A.J. McBain and C.A. O'Neill. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lysates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(16): 4887–4894.
  138. Suzuki S., S. Konnai, T. Okagawa, R. Ikebuchi, T. Shirai, Y. Sunden, C.N. Mingala, S. Murata and K. Ohashi. Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiol. Immunol.* 2013; 57(8): 600–604.
  139. Talukder A.K., M.S. Yousef, M.B. Rashid, K. Awai, T.J. Acosta, T. Shimizu, K. Okuda, M. Shimada, K. Imakawa and A. Miyamoto. Bovine embryo induces an anti-inflammatory response in uterine epithelial cells and immune cells *in vitro*: possible involvement of interferon tau

- as an intermediately. *J. Reprod. Dev.* 2017; 63(4): 425–434.
140. Theurer M.E., R.L. Larson and B.J. White. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness of commercially available vaccines against bovine herpesvirus, bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus, and parainfluenza type 3 virus for mitigation of bovine respiratory disease complex in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2015; 246(1): 126–142.
141. Toka F.N. and W.T. Golde. Cell mediated innate responses of cattle and swine are diverse during foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection: a unique landscape of innate immunity. *Immunol. Lett.* 2013; 152(2): 135–143.
142. Tomley F.M. and M.W. Shirley. Livestock infectious diseases and zoonoses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2009; 364(1530): 2637–2642.
143. Trevisi E. and A. Minuti. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Res. Vet. Sci.* 2018; 116: 47–54.
144. Trevisi E., F. Riva, J.F.S. Filipe, M. Massara, A. Minuti, P. Bani and M. Amadori. Innate immune responses to metabolic stress can be detected in rumen fluids. *Res. Vet. Sci.* 2018; 117: 65–73.
145. Usda A. A guide to calf milk replacers. 2008.
146. Uzal F.A. Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2012; 28(1): 71–77, VIII.
147. Vaughn D.E. and P.J. Bjorkman. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure.* 1998; 6(1): 63–73.
148. Vega C., M. Bok, L. Saif, F. Fernandez and V. Parreno. Egg yolk IgY antibodies: A therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. *Res. Vet. Sci.* 2015; 103: 1–10.
149. Villena J., H. Aso and H. Kitazawa. Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: role of signaling pathways and negative regulators. *Front. Immunol.* 2014; 5: 421.
150. Vlasova A.N., S. Kandasamy, K.S. Chattha, G. Rajashekara and L.J. Saif. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 172: 72–84.
151. von Buenau R., L. Jaekel, E. Schubotz, S. Schwarz, T. Stroff and M. Krueger. *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* 2005; 88(1): 317–323.
152. Waltner-Toews D., S.W. Martin, A.H. Meek, I. McMillan and C.F. Crouch. A field trial to evaluate the efficacy of a combined rotavirus-coronavirus/*Escherichia coli* vaccine in dairy cattle. *Can. J. Comp. Med.* 1985; 49(1): 1–9.
153. Walz P.H., K.P. Riddell, B.W. Newcomer, J.D. Neill, S.M. Falkenberg, V.S. Cortese, D.W. Scruggs and T.H. Short. Comparison of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus provided by multivalent viral vaccines containing inactivated fractions of bovine viral diarrhea virus 1 and 2. *Vaccine.* 2018; 36(26): 3853–3860.
154. Wang F., D.C. Ekiert, I. Ahmad, W. Yu, Y. Zhang, O. Bazirgan, A. Torkamani, T. Raudsepp, W. Mwangi, M.F. Criscitiello, I.A. Wilson, P.G. Schultz and V.V. Smider. Reshaping antibody diversity. *Cell.* 2013; 153(6): 1379–1393.
155. Weese J.S. and J. Rousseau. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005; 226(12): 2031–2034.
156. Welsh M.D., R.T. Cunningham, D.M. Corbett, R.M. Girvin, J. McNair, R.A. Skuce, D.G. Bryson and J.M. Pollock.

- Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*. 2005; 114(1): 101–111.
157. Weng M. and W.A. Walker. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *J. Dev. Orig. Health. Dis.* 2013; 4(3): 203–214.
158. Wheeler T.T., A.J. Hodgkinson, C.G. Prosser and S.R. Davis. Immune components of colostrum and milk — a historical perspective. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*. 2007; 12(4): 237–247.
159. Widders P.R., L.G. Paisley, R.P. Gogolewski, J.F. Evermann, J.W. Smith and L.B. Corbeil. Experimental abortion and the systemic immune response to “*Haemophilus somnus*” in cattle. *Infect. Immun.* 1986; 54(2): 555–560.
160. Wilkie B.N. Review of bovine immunology for the veterinary practitioner. *Can. Vet. J.* 1974; 15(9): 243–248.
161. Willing B.P., N. Gill and B.B. Finlay. The role of the immune system in regulating the microbiota. *Gut. Microbes*. 2010; 1(4): 213–223.
162. Wira C.R., J.V. Fahey, M. Rodriguez-Garcia, Z. Shen and M.V. Patel. Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72(2): 236–258.
163. Wyckoff J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 2002; 90(1–4): 395–415.
164. Xue M.Y., H.Z. Sun, X.H. Wu, J.X. Liu and L.L. Guan. Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. *Microbiome*. 2020; 8(1): 64.
165. Young W., B.C. Hine, O.A. Wallace, M. Callaghan and R. Bibiloni. Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *Peer. J.* 2015; 3: e888.
166. Zaragoza N.E., C.A. Orellana, G.A. Moonen, G. Moutafis and E. Marcellin. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(9).
167. Zhao X. J., Z.P. Li, J.H. Wang, X.M. Xing, Z.Y. Wang, L. Wang and Z.H. Wang. Effects of chelated Zn/Cu/Mn on redox status, immune responses and hoof health in lactating Holstein cows. *J. Vet. Sci.* 2015; 16(4): 439–446.
168. Zhuang Y., J.E. Futse, W.C. Brown, K.A. Brayton and G.H. Palmer. Maintenance of antibody to pathogen epitopes generated by segmental gene conversion is highly dynamic during long-term persistent infection. *Infect. Immun.* 2007; 75(11): 5185–5190.

# **III. ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ. ВАКЦИНЫ И ВАКЦИНАЦИЯ**

*Верховский О.А., Шемельков Е.В.*

- I. Механизмы формирования иммунного ответа
  - 1. Иммунитет
  - 2. Врожденный иммунитет
    - 2.1. Фагоцитоз
    - 2.2. Естественные (натуральные) киллеры
    - 2.3. Система комплемента
    - 2.4. Белки острой фазы воспаления
  - 3. Адаптивный иммунный ответ
    - 3.1. Представление антигена Т-клеткам
    - 3.2. Роль АПК в развитии специфического иммунного ответа
    - 3.3. Клеточный иммунный ответ
      - 3.3.1. CD4 Т-клеточный иммунный ответ
      - 3.3.2. CD8 Т-клеточный иммунный ответ
    - 3.4. Гуморальный иммунный ответ
  - 4. Органы иммунной системы
  - 5. Защитные механизмы поверхностей тела
  - 6. Развитие иммунной системы у плода
  - 7. Формирование пассивного иммунитета у новорожденных телят
- II. Вакцинация
- III. Типы вакцин. Стратегия их применения
- IV. Антигены. Строение и свойства
- Литература

## **Сокращения**

- АПК — антигенпрезентирующие клетки
- ГКГС (MHC) — главный комплекс гистосовместимости
- ГМ-КСМ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

- ГОА — гидроокись алюминия
- ИЛ (IL) — интерлейкины
- ИФН (IFN) — интерфероны
- КСФ — колониестимулирующие факторы
- МДП — мурамилдипептид
- ПАМП (PAMP) — патогенассоциированные молекулярные паттерны
- ПК — плазматические клетки
- ПРР (PRR) — паттернраспознающие рецепторы
- ЭР — эндоплазматический ретикулум
- CD — кластер дифференцировки (номенклатура дифференцировочных антигенов лейкоцитов)
- CTL — цитотоксические лимфоциты
- FCA — полный адьювант Фрейнда
- FIA — неполный адьювант Фрейнда
- HLB — гидрофильно/липофильный баланс
- Ig — иммуноглобулины
- NK — натуральные (естественные) киллеры
- TLR — (Toll-like receptors) Toll-подобные рецепторы
- Th1 — Т-клетки (Т-лимфоциты), активирующие макрофаги
- Th2 — Т-клетки (Т-лимфоциты) играют ключевую роль в борьбе с гельминтными инвазиями
- Th17 — Т-клетки (Т-лимфоциты) обеспечивают развитие воспаления на месте внедрения патогена с привлечением большого количества нейтрофилов, реже моноцитов
- Tfh — Т-клетки (Т-лимфоциты) (фолликулярные хелперные Т-клетки) осуществляют активацию В-клеток, соответственно развитие гуморального иммунного ответа

# I. МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

**1. Иммунитет** — невосприимчивость организма к инфекционным агентам и/или любым инородным (чужеродным) веществам как экзогенной, так и эндогенной (свои измененные клетки) природы [3, 4].

По своему происхождению, способу функционирования и механизму развития иммунитет делится на врожденный и приобретенный (адаптивный) (табл. 1). Оба они по своей сути являются специфическим ответом организма животного на воздействие патогена [2, 9, 22, 38].

Первым защитным фактором, препятствующим проникновению любых патогенов в организм животного, являются барьерные функции кожи и слизистых оболочек, нормальная микрофлора организма. В последующем, если патогенам все же удается проникнуть через кожу или слизистые оболочки (раневые по-

верхности), в действие вступают механизмы врожденного, а затем и адаптивного иммунного ответа (*рис. 1*) [10, 38].

Врожденный иммунитет основан на механизмах, заложенных во внутриутробный период развития, и обеспечивает готовность организма животного бороться с возможными патогенами еще до первого контакта с ними [11].

Адаптивный иммунный ответ начинает развиваться только после первого взаимодействия патогена и организма животного. Многие микроорганизмы в процессе эволюции научились обходить механизмы врожденного иммунитета, однако адаптивный иммунный ответ более целенаправлен и способен бороться с подавляющим числом инфекционных патогенов (*рис. 2*) [22].

В то же время врожденный и адаптивный иммунитет имеют свои механизмы контроля, предотвращающие (в норме) развитие иммунологических реакций против собственных клеток и тканей организма [2, 11, 22, 38].

Таблица 1. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета

	Врожденный	Адаптивный
<b>Компоненты</b>		
Физико-химические барьеры	кожа, слизистые оболочки	иммунная система кожи и слизистых, антитела в секретах слизистых оболочек
Белки крови	система комплемента, белки острой фазы воспаления и различные цитокины	антитела и цитокины, секреции лимфоцитами
Клетки	фагоциты (макрофаги, моноциты, нейтрофилы) и естественные киллеры	лимфоциты (T- и B-клетки)
<b>Характеристики</b>		
Специфичность	распознаются антигенные комплексы, общие для определенных групп микроорганизмов	Распознаются отдельные антигены, специфичные для каждого микроорганизма
Разнообразие специфических рецепторов	ограниченное	очень большое
Иммунологическая память	отсутствует или ограничена	хорошо развита
Основные иммунологические реакции	фагоцитоз; альтернативный путь активации комплемента	клеточный (CTL, Th1, Th2 Th17, Tfh) и гуморальный (IgM, IgG, IgA) иммунный ответ; антитело-зависимая клеточная цитотоксичность; фагоцитоз с участием антител; классический путь активации комплемента

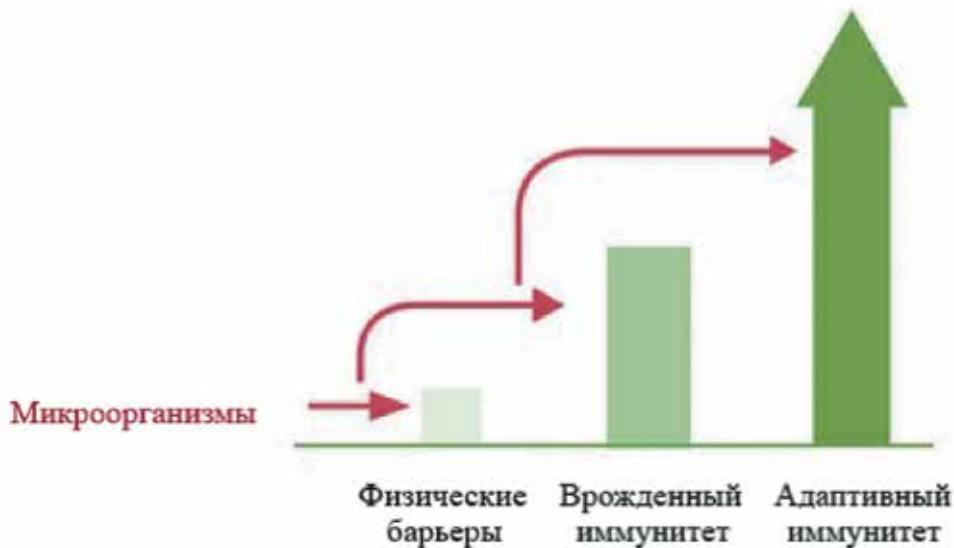


Рис. 1. Основные защитные механизмы организма животного  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

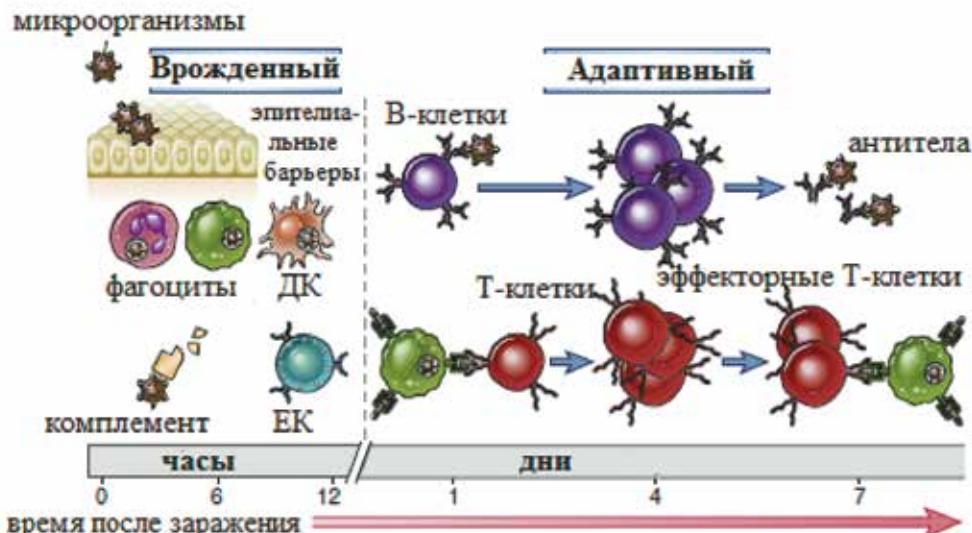


Рис. 2. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017).

Механизмы врожденного иммунитета обеспечивают начальный этап защиты. Адаптивные иммунные реакции развиваются позже и требуют активации лимфоцитов. ДК — дендритные клетки; ЕК — естественные киллеры

## 2. Врожденный иммунитет

Врожденный иммунитет — комплекс предсуществующих защитных факторов, обусловленный анатомическими, физиологическими, клеточными и молекулярными особенностями, закрепленными генетически [9, 11, 22, 35].

Первым фактором врожденного иммунитета являются барьерные функции кожи и слизистых оболочек организма животного. Но если не удается сдержать проникновение патогенов, с ними незамедлительно начинается борьба, которая заполняет временное бездействие адаптивного иммунитета, давая организму животного время на подготовку более сильного и направленного иммунного ответа [11, 15].

Быстрое вовлечение клеток врожденного иммунитета в борьбу обеспечивается за счет того, что они распознают не отдельные виды микроорганизмов или возбудителей, а общие антигенные комплексы, получившие название «патогенассоциированные молекулярные паттерны» (ПАМП). ПАМП присущи большинству видов микроорганизмов (вирусы, бактерии, грибы, простейшие) и отсутствуют у многоклеточных организмов. Для распознавания ПАМП клетки врожденной иммунной системы имеют специальные паттернрраспознающие рецепторы (ПРР), которые имеют разное функциональное назначение:

- рецепторы, опосредующие фагоцитоз и эндоцитоз;
- рецепторы, активирующие клетки врожденной иммунной системы;
- опсонины и рецепторы, активирующие комплемент.

Toll-like receptors (TLR) играют ключевую роль в распознавании патогенов и активации врожденного иммунитета. По функциональному назначению они делятся на две группы: расположенные на поверхности клеток — распознают ПАМП микроорганизмов и расположенные внутри клеток — распознают РНК и ДНК вирусов и бактерий [17, 22].

Лектиновые рецепторы — поверхностные рецепторы, распознающие углеводные остатки.

Рецепторы-«мусорщики» распознают липопротеины низкой плотности; играют важную роль в удалении апоптотических клеток.

Группы внутриклеточных ПРР (DAI-рецепторы, NOD- и RIG-подобные рецепторы) распознают молекулы РНК и ДНК микроорганизмов.

Различные молекулы адгезии (селектины, интегрины) обеспечивают функциональное взаимодействие клеток иммунной системы. Они участвуют не только в распознавании патогенов, но и в эффекторной фазе врожденного иммунного ответа.

Взаимодействие ПРР с соответствующими лигандами (ПАМП, нуклеиновые кислоты микроорганизмов и др.) вызывает активацию клеток врожденного иммунитета, запуская комплекс клеточных и гуморальных факторов, направленных на обезвреживание и элиминацию патогенов [35].

Активация врожденного иммунитета может происходить не только под действием патогенов экзогенной природы (вирусы, бактерии, грибы, токсины), но и посредством группы веществ эндогенного происхождения, которые могут образовываться в результате повреждения и/или гибели отдельных клеток и тканей. Данные вещества (комплекс молекул) получили общее название ДАМП (от английского *Damage-Associated Molecular Patterns* — молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением) или аларминов, которые сигнализируют об эндогенной опасности [11, 17, 35].

Основными эффекторными клетками врожденного иммунитета являются фагоциты (макрофаги — рис. 3, нейтрофилы — рис. 4) и естественные киллеры [22, 38].

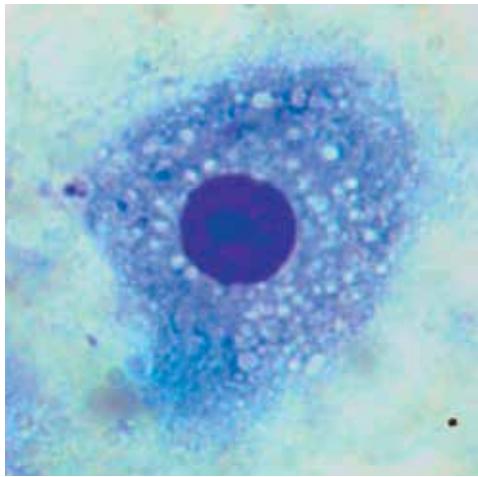


Рис. 3. Макрофаг КРС. Увеличение 1×500  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

**2.1. Фагоцитоз** — один из главных факторов врожденного иммунитета, открытый И.И. Мечниковым (рис. 5). Методом хемотаксиса фагоциты перемещаются в очаг поражения, где распознают патогены, для этого на своей поверхности они экспрессируют рецепторы, в том числе и ППР. Фагоциты также имеют высокочувствительные рецепторы к опсонинам (молекулы антител, белки системы комплемента и др.), поэтому фагоцитоз опсонизированных патогенов проходит намного быстрее и эффективнее.

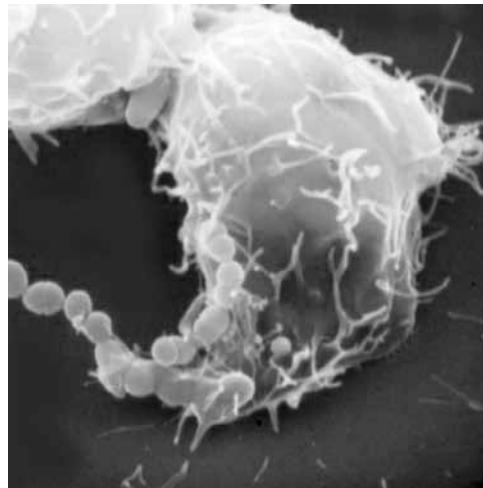


Рис. 4. Микроэлектронная фотография нейтрофила КРС, поглощающего бактерии *Streptococcus agalactiae* в молоке.  
Увеличение 1×5000  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

Распознавание патогена фагоцитом приводит к активации последнего, после чего патоген погружается внутрь фагоцита и разрушается (посредством различных ферментов, кислой среды, при участии активного кислорода и оксида азота, а также других факторов) [6, 35].

Помимо экзогенных патогенов, путем фагоцитоза удаляются апоптотические клетки макроорганизма.

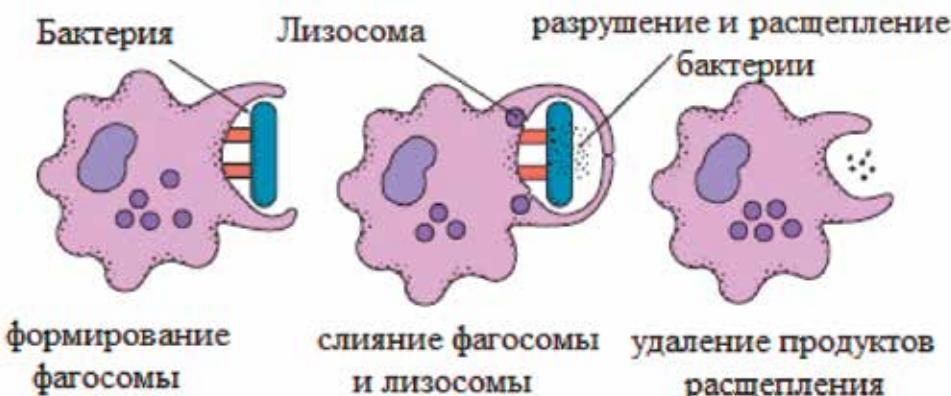


Рис. 5. Схема фагоцитоза (Immunology, Male D. et al., 2013)

**2.2. Естественные (натуральные) киллеры** распознают и уничтожают инфицированные, а также свои измененные клетки методом контактного цитолиза (рис. 6), который развивается по одному из двух путей. Распознавая клетки-мишени, естественные киллеры прикрепляются к ним и выпускают внутрь лethальные вещества, вызывающие гибель клеток или запускают процесс апоптоза. После этого они отсоединяются от погибающей клетки и вновь готовы к выполнению своей функции. Одним из факторов, запускающих механизм распознавания клеток-мишеней естественными киллерами, является отсутствие молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I класса на их поверхности [2, 19, 22, 27].

Натуральные киллеры составляют около 3,5% лимфоцитов крови у телят и около 2% у взрослых животных. В наиболее высокой концентрации они присутствуют в селезенке, лимфатических узлах и периферической крови. Натуральные киллеры КРС уничтожают клетки, инфицированные вирусами па-

рагриппом-3, лейкемии и герпеса I типа. Участвуют в защите организма от микробактерий, предотвращая их репликацию в макрофагах, играют важную роль в устойчивости к простейшим паразитам *Neospora caninum*, продуцируя IFN- $\gamma$ .

Основными компонентами **гуморального фактора врожденного иммунитета** являются: система комплемента, белки острой фазы воспаления и различные цитокины [11, 28].

**2.3. Система комплемента** — комплекс сывороточных белков, белков клеточных мембран, патернрраспознающих рецепторов и различных регуляторных молекул, каскадная активация которых в конечном счете ведет к гибели патогена (чаще это грамотрицательные бактерии) за счет образования поры в клеточной стенке, через которую поступает вода, вызывая его гибель.

Система комплемента — мощнейший инструмент врожденного иммунитета, однако она же играет существенную роль в регуляции и эффекторной фазе адаптивного иммунного ответа (рис. 7) [11, 22, 38].

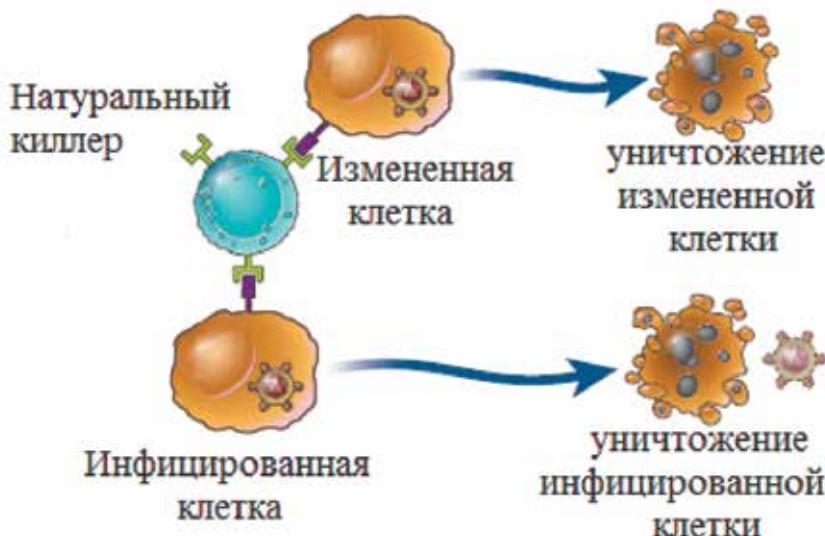


Рис. 6. Функция натуральных киллеров  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

### 1. Опсонизация и фагоцитоз



### 2. Стимуляция воспалительных реакций



### 3. Комплмент опосредованный лизис

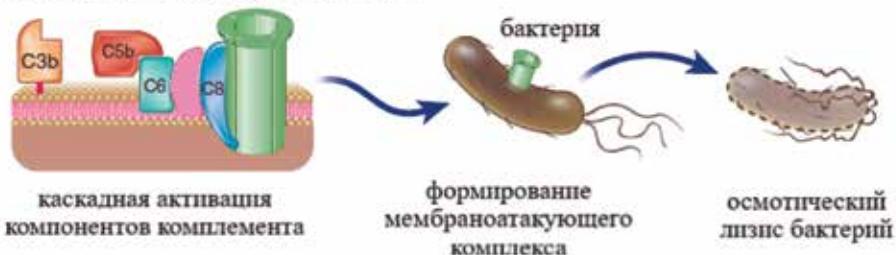


Рис. 7. Функции системы комплемента  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

Свое название система комплемента получила благодаря экспериментам Жюля Борде вскоре после открытия антител. Он показал, что если к сыворотке крови, заведомо содержащей специфические антитела, добавить соответствующий вид бактерий, то происходит их лизис (при температуре реакции 37°C). Однако если эту же пробу сыворотки крови предварительно прогреть при температуре 56°C и потом добавить бактерии, то их лизис не происходит. При этом антитела являются достаточно термостабильными и способны вызывать агглютинацию бактерий после указан-

ного термического воздействия. Следовательно, нативная сыворотка крови содержит другой дополнительный термонастабильный компонент, который вызывает лизис бактерий или активирует антитела к более эффективному уничтожению. Этот компонент был назван комплементом (от английского *complement* — ‘дополнение’) [22, 38].

Компоненты системы комплемента находятся в неактивном состоянии, соответственно, для развития каскада реакций, приводящих к эффекторной функции комплемента, необходима их активация.

Особенности системы комплемента:

- активируется патогенами или антителами, специфически связавшимися с этими патогенами;

- развитие каскада реакций системы комплемента состоит из последовательного расщепления белковых протеолитических комплексов, в результате чего высвобождаются протеазы следующего порядка. Каскадность реакций позволяет быстро усиливать развитие всего комплекса, поскольку одна молекула протеазы, высвобожденная на предыдущей стадии, активирует несколько молекул протеаз на следующей стадии;

- многие из биологически активных продуктов расщепления белков системы комплемента ковалентно связываются с рецепторами на поверхности микробных или апоптических клеток, а также с Fc-фрагментами антител, вступивших в специфическое взаимодействие с патогеном, тем самым обусловливая их опсонизацию, что в последующем облегчает их уничтожение;

- биологически активные продукты расщепления белков системы комплемента также стимулируют развитие воспалительных реакций, что создает условия для привлечения в зону воспаления фагоцитов;

- развитие реакций системы комплемента тормозится регулирующими белками, которые присутствуют в нормальных клетках хозяина и отсутствуют у микроорганизмов [11, 22, 38].

Существует три пути активации системы комплемента: классический (активируется посредством взаимодействия с иммуноглобулинами класса G — IgG или M — IgM, которые специфически связались с патогеном), альтернативный (активируется при взаимодействии с рецепторами микробных клеток, без участия антител) и лектиновый (активируется при взаимодействии особых белков с полисаха-

ридами или гликанами на поверхности микробных клеток).

Классический и альтернативный пути активации получили свои названия следующим образом: классический путь был открыт и охарактеризован раньше, чем альтернативный, однако последний филогенетически является старше.

Альтернативный и лектиновый пути являются эффекторными механизмами врожденного иммунитета, тогда как классический путь является важным механизмом адаптивного гуморального иммунного ответа.

Белки системы комплемента, вступающие в каскадную реакцию, получили обозначение буквой «C» с добавлением порядкового номера. В ходе расщепления неактивных белков C3, C4 и C5 образуются два активных компонента: один большего размера, обозначается латинской буквой b (является активной протеазой, расщепляющей следующий неактивный компонент), другой меньшего размера, обозначается латинской буквой a (является биологически активным компонентом, который регулирует воспалительный процесс).

Независимо от того, каким путем был запущен каскад реакций, все они приводят к расщеплению белка C3, после чего развитие реакции продолжается уже по одной общей схеме [11, 15, 22, 27, 38].

## Альтернативный путь активации комплемента

Активация системы комплемента по альтернативному пути начинается с взаимодействия белка C3 со специфическими компонентами стенки микробной клетки, в результате чего он расщепляется на фрагменты C3b и C3a. Часть фрагмента C3b ковалентно связывается с соответствующими рецепторами микробной клетки, несвязавшиеся фрагменты быстро деактивируются (рис. 8).

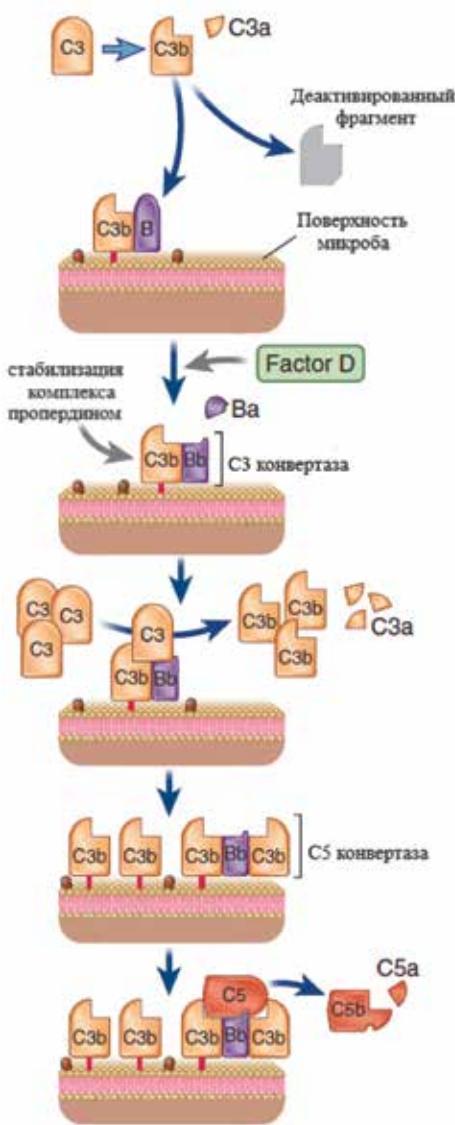


Рис. 8. Альтернативный путь активации системы комплемента  
(Cellular and Molecular Immunology,  
Abul K. Abbas et al., 2017)

К фрагменту C3b на поверхности микробной клетки присоединяется фактор B, который под воздействием протеазы (получившей название фактор D) расщепляется на фрагменты Ba и Bb, последний остается связанным с фрагментом C3b. Образовавшийся комплекс C3bBb

(получивший название C3 конвертаза) активно расщепляет неактивные молекулы белка C3, при этом часть образовавшихся фрагментов C3b также присоединяется к рецепторам на поверхности микробной клетки, а часть — к уже имеющемуся комплексу C3bBb, образуя комплекс следующего порядка C3bBbC3b (получивший название C5 конвертаза).

Одним из факторов, стабилизирующих комплекс C3bBb (C3 конвертаза), является белок пропердин, который секрециируется нейтрофилами, макрофагами, Т-клетками.

Активация системы комплемента по альтернативному пути возможна только на поверхности микробных клеток и невозможна на поверхности клеток млекопитающих [11, 22, 28, 38].

## Классический путь активации комплемента

Классический путь активации системы комплемента инициируется взаимодействием белка C1 с фрагментами молекул IgG или IgM, которые вступили в специфическое взаимодействие с патогеном. Компонент C1 — это большой белковый комплекс, который состоит из субъединицы C1q и протеаз C1 $\alpha$  и C1 $\beta$  (*рис. 9*).

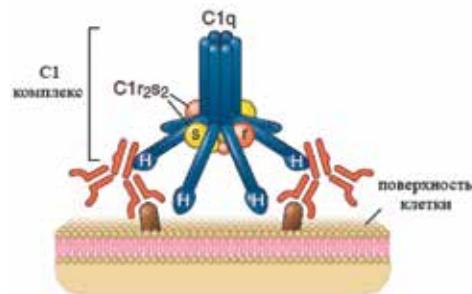


Рис. 9. Строение комплекса C1  
(Cellular and Molecular Immunology,  
Abul K. Abbas et al., 2017)

C1q представляет собой зонтичный радиальный массив из шести цепочек, каждая из которых имеет шаровидную головку, предназначенную для соединения с молекулами иммуноглобулинов. Активировать систему комплемента через белок C1 могут только антитела, связанные с патогеном. Свободно циркулирующие антитела не могут активировать комплемент по следующей причине: для активации белка C1 нужно, чтобы минимум две из шести цепочек субъединицы C1q вступили в контакт с фрагментами антител. Одна молекула IgG может соединиться только с одной цепью C1q, следовательно, для того чтобы инициировать активацию, две молекулы IgG должны оказаться достаточно близко друг от друга, при этом их расположение должно быть удобным для контакта с C1q (рис. 10). Такое пространственное расположение молекул IgG, как правило, встречается на поверхности микробной клетки.

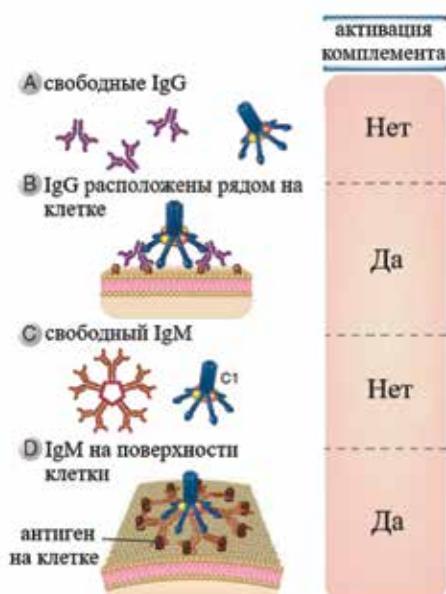


Рис. 10. Взаимодействие комплекса C1 с молекулами IgG и IgM  
(Cellular and Molecular Immunology,  
Abul K. Abbas et al., 2017)

Молекулы IgM представляют собой пентаэдры, и теоретически одна молекула IgM может связаться с двумя и более цепями C1q, однако свободные IgM имеют конформацию, не позволяющую вступить в контакт с C1q, и только после специфического взаимодействия IgM с патогеном меняется их конформационная структура и открываются участки для взаимодействия с цепями C1q (рис. 10).

IgM обладают большей способностью к активации системы комплемента, чем IgG. Данный факт имеет большое значение с точки зрения защиты организма, поскольку IgM — это ранние антитела, которые менее специфичны и соответственно хуже справляются со своей эффекторной функцией (нейтрализация патогена) по сравнению с антителами IgG. Но в противовес этому они более эффективно включают в защитные реакции механизмы врожденного иммунитета.

Активация субъединицы C1q провоцирует активацию протеазы C1r, которая активирует протеазу C1s. Она расщепляет белок C4 на фрагменты C4a и C4b, последний ковалентно связывается с комплексом антиген-антитело или с соответствующими рецепторами микробной клетки, с которой вступили в специфическое взаимодействие активирующие всю реакцию антитела (рис. 11).

Главная функция фрагмента C4b — гарантирование того, что активация комплемента происходит на поверхности микробной клетки.

Следующий белок комплемента C2 расщепляется протеазой C1s на фрагменты C2a и C2b. Фрагмент C2a присоединяется к фрагменту C4b, который находится на поверхности микробной клетки, образовавшийся комплекс C4bC2a является C3 конвертазой. C3 конвертаза расщепляет не-

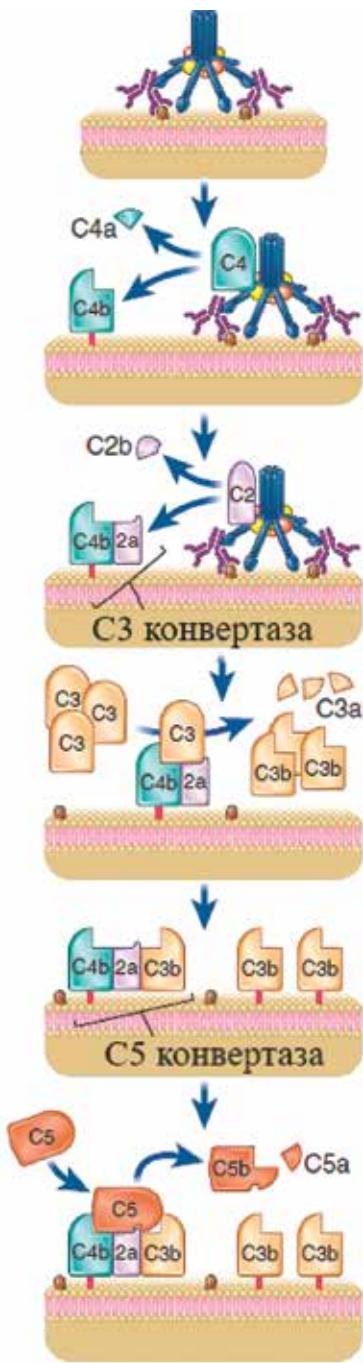


Рис. 11. Альтернативный путь активации системы комплемента  
 (Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

активный белок С3 на фрагменты С3а и С3б, часть фрагментов последнего присоединяется к комплексу С4bС2а, образуя комплекс следующего порядка С4bС2аС3б (С5 конвертазу).

При этом часть фрагментов С3б может самостоятельно прикрепляться к поверхности микробной клетки и в дальнейшем, прикрепляя фактор В, развивать активацию комплемента по механизму альтернативного пути, как описано ранее.

С момента образования С5 конвертазы классический и альтернативный пути активации системы комплемента развиваются по одному механизму [11, 15, 22, 28, 38].

### Лектиновый путь активации комплемента

Механизм лектинового пути активации системы комплемента во многом схож с таковым при классическом пути и отличается лишь на начальных этапах. В этом случае роль субъединицы С1q играют лектины (манноз-связывающий лектин, фиколины), которые связываются не с молекулами антител, вступившими в контакт с патогеном, а непосредственно с полисахаридами или гликанами на поверхности микробных клеток. Функцию протеаз С1г и С1с выполняют протеазы MASP1 и MASP2, последняя расщепляет белок С4. Последующее развитие событий аналогично механизму классического пути активации комплемента (рис. 12) [11, 15, 22, 28, 38].

*Формирование мембраноатакующего комплекса системы комплемента.* Обе С5 конвертазы (С3bBbC3b и С4b-C2aC3b) вызывают расщепление белка С5 на фрагменты С5а и С5б. С5а высвобождается и в последующем

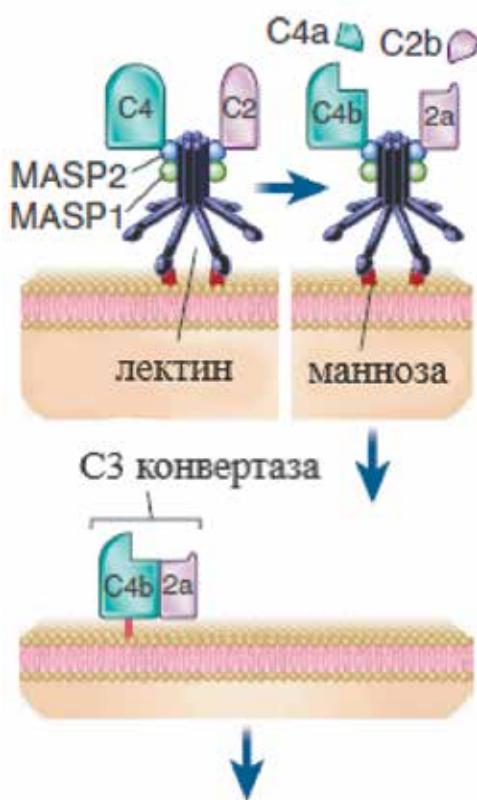


Рис. 12. Лектиновый путь активации системы комплемента  
(Cellular and Molecular Immunology,  
Abul K. Abbas et al., 2017)

участвует в развитии воспалительных реакций в качестве биологически-активного фактора.  $C5b$  также освобождается от комплекса  $C5$  конвертазы ( $C3bBbC3b$  или  $C4bC2aC3b$ ), но быстро взаимодействует с белком  $C6$ , меняя его конформацию (рис. 13).

Комплекс  $C5b-C6$  связывается с клеточной мембраной посредством ионных и гидрофобных связей. Затем к этому комплексу последовательно присоединяются белки  $C7$  и  $C8$ , которые, кроме того, имеют лиофильные участки, усиливающие связь комплекса с мембраной клетки (рис. 13).

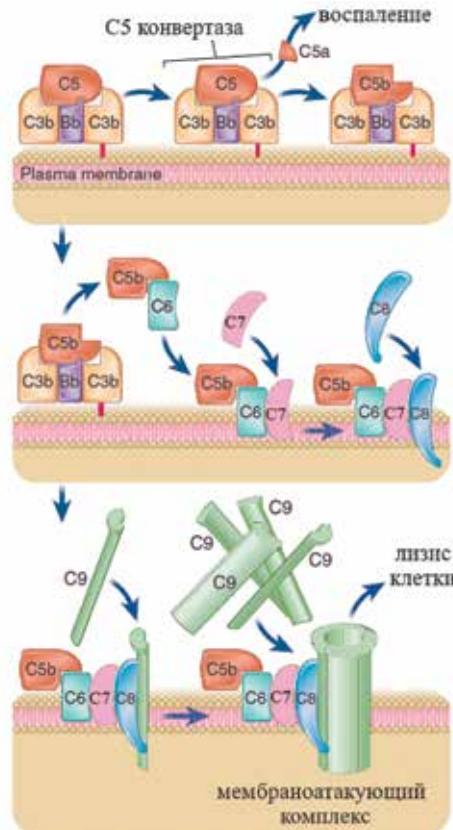


Рис. 13. Формирование мембраноатакующего комплекса  
(Cellular and Molecular Immunology,  
Abul K. Abbas et al., 2017)

Комплекс  $C5bC6C7C8$  способен образовывать небольшие поры (0,4–3,0 нм в диаметре) в мембране клеток. На финальном этапе к этому комплексу присоединяется белок  $C9$  (12–20 молекул). Комплекс  $C5bC6C7C8C9$  способен образовывать большие поры (до 20 нм в диаметре и до 11 нм высотой) в мембране клеток, через которые в клетку поступает вода и ионы, вызывая ее разбухание и гибель.

К комплемент-зависимому лизису чувствительны грамотрицательные бактерии и вирусы. Однако многие вирусы научились уходить от действий

вия системы комплемента, поэтому ее эффективность в отношении данных вирусов достаточно невысокая. Грам-положительные бактерии устойчивы к комплементу из-за своей толстой клеточной стенки.

Протеолитические фрагменты комплемента С5а, С4а и С3а вызывают местные острые воспалительные реакции, активируя тучные клетки, нейтрофилы и эндотелиальные клетки. Все три пептида связываются с тучными клетками, вызывая их дегрануляцию и высвобождение вазоактивных медиаторов, таких как гистамин [11, 15, 22, 28, 38].

**2.4. Белки острой фазы воспаления** активируют фагоциты, систему комплемента, усиливают опсонизацию микрорганизмов, участвуют в активации и деактивации различных протеаз, играют роль переносчиков физиологически активных факторов.

Цитокины — низкомолекулярные белки, опосредующие межклеточное взаимодействие при развитии иммунного ответа, пролиферацию и функциональную активность многих клеток иммунной системы, а также иммунорегуляцию. Цитокины не обладают специфичностью в отношении антигенов, но отвечать на их действие способны лишь те клетки, которые имеют соответствующие рецепторы к данному конкретному цитокину.

Цитокины включают в себя следующие группы белков:

1. Интерлейкины (ИЛ): основная функция — регуляция межклеточного взаимодействия клеток при развитии иммунного ответа. Некоторые ИЛ обладают противовирусной активностью. В развитии врожденного иммунитета наиболее значимое участие принимают ИЛ-1, -6, -12, -15, -18.

2. Интерфероны (ИФН) — обладают выраженным противовирусным действием, активно участвуют в регуляции иммунных процессов и межклеточном

взаимодействии. Выделяют три типа ИФН: I (ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ , ИФН- $\epsilon$  и др.), II (ИФН- $\gamma$ ) и III (ИФН- $\lambda$ ). Факторами врожденного иммунитета являются ИНФ I и III типов, которые стимулируют активность фагоцитов и естественных киллеров, усиливают защиту от внутриклеточных патогенов и пр.

3. Хемокины — хемоаттрактанты, обеспечивающие хемотаксис лейкоцитов в очаг воспаления.

4. Факторы некроза опухолей — группа белков (фактор некроза опухолей- $\alpha$ , лимфотоксины и др.) участвуют в межклеточных взаимодействиях, обладают противоопухолевой активностью (вызывают некроз ряда опухолей).

5. Колониестимулирующие факторы (КСФ) — регулируют деление и дифференцировку стволовых клеток костного мозга: нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, предшественников Т- и В-лимфоцитов [2, 11, 19, 22, 35].

Все защитные факторы врожденного иммунитета в той или иной мере участвуют при развитии адаптивного иммунного ответа и не только в роли активирующих агентов, но и в качестве эффекторных компонентов. В этом случае их функции и свойства усиливаются и направляются факторами адаптивного иммунитета. Т.е. взаимодействие между компонентами врожденного и приобретенного иммунитета не одностороннее от врожденного к приобретенному (активация), а обоюдно направленное от врожденного к приобретенному (активация) и, наоборот, от приобретенного к врожденному (направление и усиление) [2, 19, 28].

### **3. Адаптивный иммунный ответ**

Развитие адаптивного иммунного ответа обусловлено развитием Т- и В-систем иммунитета (клеточный и гуморальный).

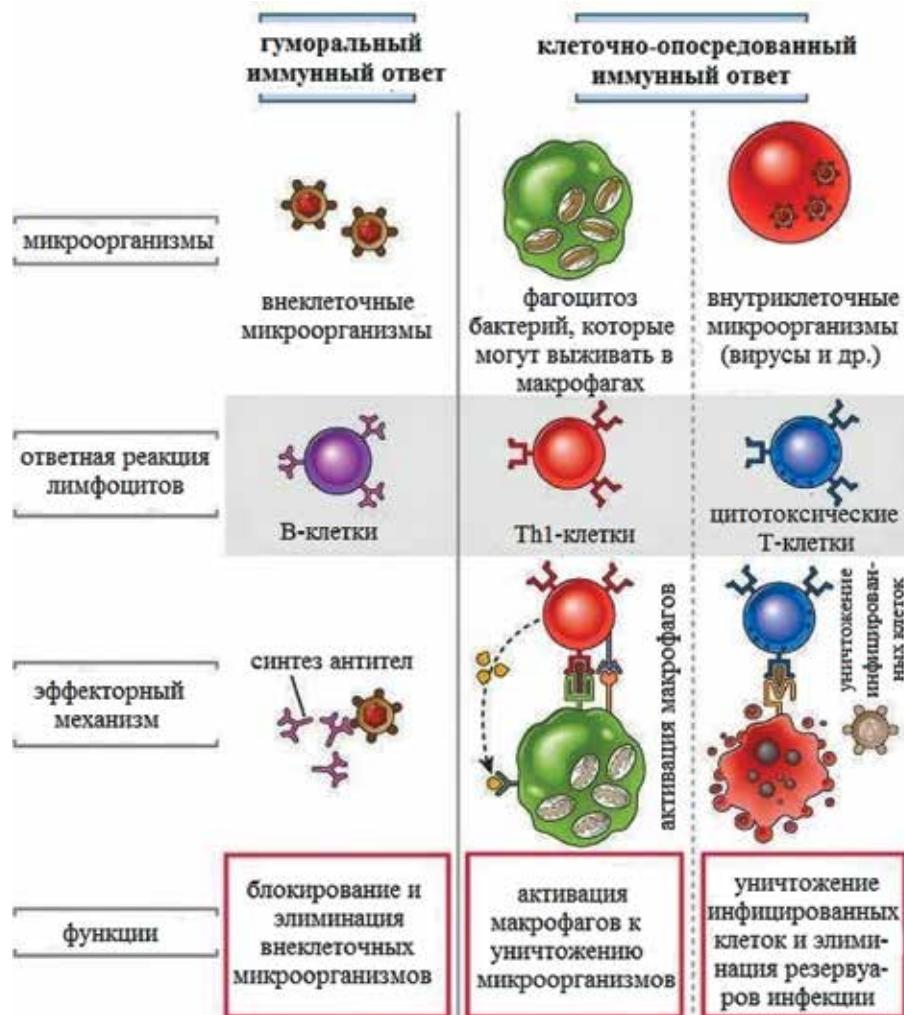


Рис. 14. Типы адаптивного иммунного ответа  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2015)

моральный иммунные ответы, рис. 14), которое включает в себя два основных этапа [21].

Первый, так называемый доантигенный, период развития представлен комплексом событий, направленных на создание потенциала клеточных и молекулярных механизмов, необходимых для будущих возможных встреч с антигеном (патогеном). Именно на этом этапе происходит онтогенетическая закладка систем, дифференцировка

прекурсоров иммунокомпетентных клеток до функционально подготовленных (способных отвечать на антиген) Т- и В-клеток (лимфоцитов); формирование специфических клеточных клонов, взаимодействующих только с одной из множества антигенных детерминант; элиминация (удаление) клонов, реагирующих на собственные антигены; дифференцированное заселение периферических лимфоидных органов и тканей [4, 11].

Второй, постантогенный период, связан с прямым функционированием Т- и В-систем, который включает в себя три этапа:

- распознавание антигена функционально незрелыми (наивными) Т- или В-клетками;
- ответную реакцию этих клеток на антиген в виде пролиферации и дифференцировки до зрелых эффекторных клеток;
- собственно эффекторную fazу —нейтрализацию и уничтожение антигена.

Процентное соотношение различных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови крупного рогатого скота: Т-клетки — 45–53% (из них CD4 8–31%, CD8 10–30%), В-клетки — 16–21% [11, 15, 22, 28, 38].

### 3.1. Представление антигена для Т-клеток

В-клетки на своей поверхности имеют рецепторы, которые могут самостоятельно распознать антиген, не связанный с какими-либо белками. Т-клетки способны лишь к взаимодействию с антигенными эпитопами, которые включены в комплекс с молекулами ГКГС I или II класса.

Подготовка антигена к его распознаванию Т-клетками происходит в антигенпрезентирующих клетках (АПК) [2, 3, 28].

Основным местом внутриклеточной локализации вирусов является цитозоль. Процесс выхода вирусных белков в иммуногенной форме (в комплексе с молекулами ГКГС I класса) на поверхность АПК происходит следующим образом.

Вирусные белки, локализующиеся в цитозоле клетки, подвергаются деградации до отдельных пептидов при помощи каталитического протеазного комплекса — протеосомы, (рис. 15-А) [21].

Образовавшиеся пептидные фрагменты проникают из цитозоли клетки во внутреннее пространство эндоплазматического ретикулума при помощи специальных транспортных белков ТАР-1 и ТАР-2, которые образуют гетеродимер на эндоплазматической мембране, служащий «воротами» для прохождения пептидов.

В полости эндоплазматического ретикулума вирусные пептиды взаимодействуют с уже синтезированными здесь молекулами ГКГС I класса. Соединенные  $\alpha$ -цепь и  $\beta_2$ -микроглобулин полноценной молекулы ГКГС I класса стабилизированы от распада при помощи белка калнексина. При встрече вирусного пептида и молекулы ГКГС I класса происходит отрыв калнексина, и образуется комплекс пептид-молекула ГКГС I класса. В дальнейшем этот комплекс транспортируется через аппарат Гольджи к клеточной поверхности, где он экспрессируется в иммуногенной форме, доступной для CD8 Т-клеток [4, 19].

На рис. 15-А представлена схема образования комплекса антиген-ГКГС I класса. На рис. 15-Б представлена схема образования комплекса антиген-ГКГС II класса. ЭР — эндоплазматический ретикулум; ТАР — транспортные белки (ТАР-1 и ТАР-2).

В случае бактериальной/грибковой инфекции или поражения одноклеточными паразитами процесс подготовки антигенных пептидов к взаимодействию с Т-клетками (CD4) происходит следующим образом. В результате эндоцитоза бактерии, их токсины или простейшие оказываются заключенными в фагосомы, после слияния фагосом и лизосом образуются фаголизосомы, где захваченный материал подвергается гидролитическому расщеплению протеазами при низких значениях рН. Параллельно

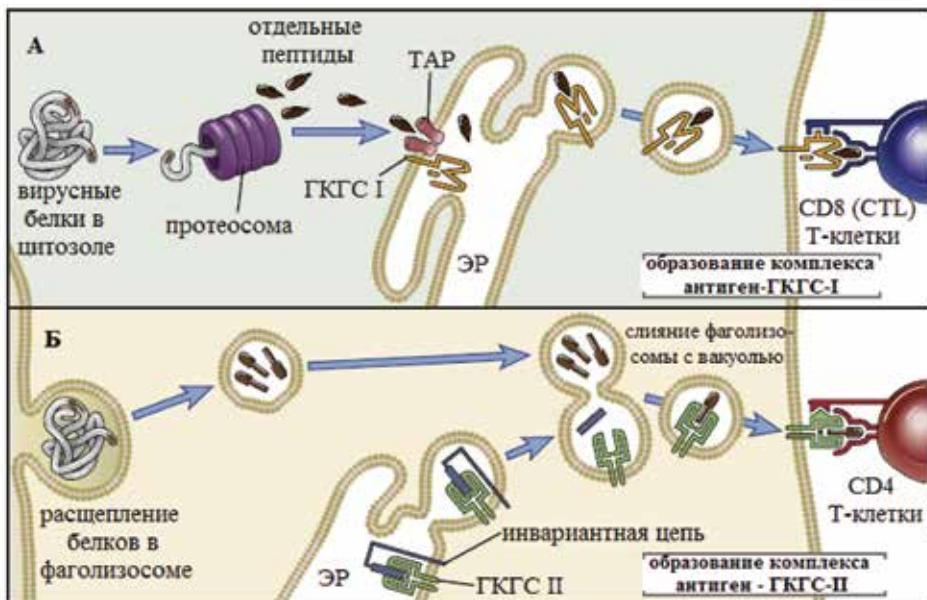


Рис. 15. Образование комплексов антиген-ГКГС  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2015)

во внутреннем пространстве эндоплазматического ретикулума происходит синтез молекул ГКГС II класса. Готовые молекулы ГКГС II класса ингибираны так называемой инвариантной цепью, которая предотвращает их случайное взаимодействие с пептидами внутриэндоплазматического пространства. Этот комплекс покидает эндоплазматический ретикулум через аппарат Гольджи и образует самостоятельную вакуоль (рис. 15-Б). В дальнейшем происходит слияние фаголизосомы, содержащей антигенные пептиды и кислые протеазы, с вакуолью, в которой находится молекула ГКГС II класса, связанная инвариантной цепью. Протеазы разрушают инвариантную цепь, и происходит образование комплекса пептид-молекула ГКГС II класса, который транспортируется к поверхности клетки и экспрессируется в иммуногенной форме, доступной для CD4 Т-клеток [19, 21, 26].

### 3.2. Роль АПК в развитии специфического иммунного ответа

В периферической лимфоидной ткани имеются три типа АПК: дендритные клетки (играют ведущую роль и являются наиболее эффективными для активации наивных Т-клеток), макрофаги и В-клетки (выполняя функцию АПК, активируют в основном хелперные CD4 Т-клетки).

Роль АПК в развитии специфического иммунного ответа заключается в представлении антигенных пептидов Т-клеткам в комплексе с молекулами ГКГС I или II класса, т.е. придаании антигену иммуногенных свойств. Но для активации Т-клеток одного взаимодействия с комплексом пептид-молекула ГКГС I или II класса, экспрессированного на поверхности АПК, недостаточно. Для этого необходим второй сигнал, который обеспечивается взаимодействием костимуляторов B7.1 и B7.2 (они же CD80 и CD86) на поверхности АПК

с рецептором CD28 на поверхности Т-клеток. Процесс взаимодействия между АПК и Т-клетками усиливается в случае контакта между молекулами межклеточной адгезии ICAM-1 и LFA-1, а также маркеров CD48 и CD2, представленных на АПК и Т-клетках соответственно (рис. 16) [11, 35].

На рисунке приведена схема представления комплекса пептид – молекула ГКГС I класса (APC) Т-клетке (T cell), TCR – рецепторы Т-клетки. Аналогичным образом происходит презентация антигена в комплексе с молекулой ГКГС II класса.

Наивные Т-клетки впервые встречаются с антигеном в лимфоидной ткани, ближайшей к месту его внедрения. В кортикальной зоне лимфатических узлов Т-клетки контактируют с АПК, на начальном этапе это неспецифическое взаимодействие. Адгезины Т-клеток и

АПК вступают в межклеточный контакт, он непрочный, и низкая аффинность адгезинов позволяет Т-клетке вступать в контакт со многими АПК, пока не произойдет специфическое распознавание. Как только Т-клетка находит «свой» специфический антиген, ее перемещение заканчивается и стабилизируется связь между Т-клеткой и АПК, образуется зона устойчивого межклеточного контакта – иммунный синапс. Связывание антигена-специфического рецептора Т-клетки с комплексом пептид – молекула ГКГС и включение в комплексообразование корецепторов CD8 или CD4 обеспечивает формирование первого сигнала к пролиферации и дифференцировке этой клетки. Второй сигнал, необходимый для нормального развития наивной Т-клетки в зрелый эффектор, обеспечивают ко-стимуляторы B7, экспрессированные на поверхности АПК. Для взаимодействия

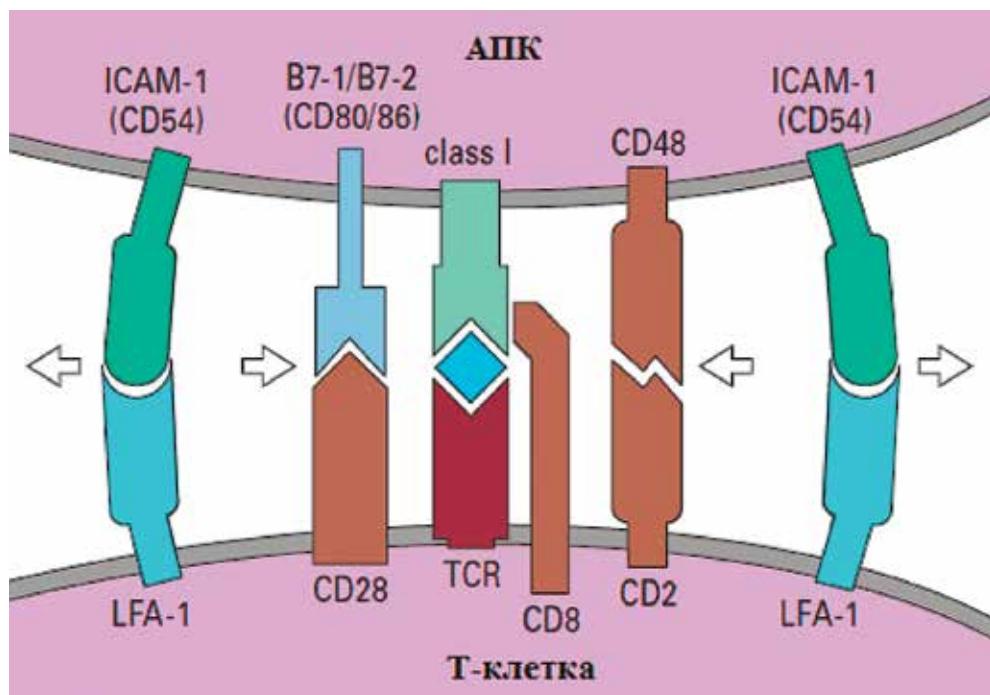


Рис. 16. Диаграмма иммунологического синапса (Immunology, Male D. et al., 2013)

с молекулами костимуляторов наивные Т-клетки синтезируют и экспрессируют на свою поверхность рецепторы CD28 (рис. 17) [6, 27, 35].

Если взаимодействие Т-клетки со специфическим комплексом пептид – молекула ГКГС не подкрепляется вторым сигналом, то активация такой Т-клетки не происходит, она подвергается анергии, соответственно комплекс иммунологических реакций не развивается.

Если происходит контакт между молекулами костимуляторов B7 и рецептором CD28, то Т-клетка подвергается активации, что влечет за собой последующие реакции.

Таким образом, для полноценной активации Т-клеток необходимо наличие двойного сигнала, отсутствие которого является препятствием для развития ответа к собственным антигенам.

Через некоторое время после активации Т-клетки на ее поверхности появляются рецепторы CTLA-4, которые обладают гораздо более выраженным сродством к молекулам костимуляторов B7, однако в результате этого контакта образуется сигнал, который имеет противоположный эффект – ингибирование Т-клетки. Т.е. за счет своего более высокого сродства контакты с рецепторами CTLA-4 вытесняют контакты с рецепторами CD28, что

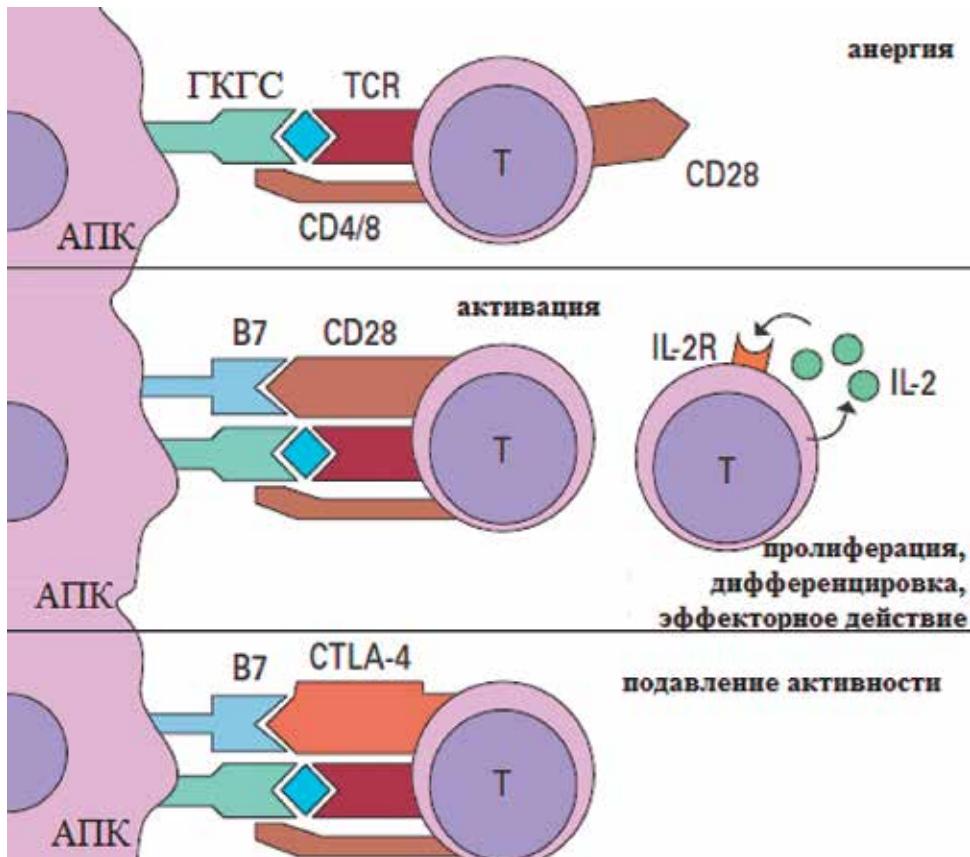


Рис. 17. Двойной сигнал для активации Т-клеток (Immunology, Male D. et al., 2013)

ведет к завершению активационных процессов [11, 19, 28, 35].

**Дендритные клетки** (ДК) играют ведущую роль в запуске адаптивного иммунного ответа; в активированном состоянии (после контакта с антигеном) обладают ярко выраженной экспрессией на своей поверхности молекул ГКГС I и/или II класса, костимуляторов B7.1 и B7.2, что создает условия для включения в полноценный ответ Т-клеток.

ДК эффективно распознают разнообразные патогенассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП) и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (ДАМП) за счет большего количества TLR и других рецепторов на их поверхности, что делает их гораздо более эффективными по сравнению с другими АПК. Только дендритные клетки способны активировать наивные (ранее не имевшие контакт с антигеном) Т-клетки. Морфологически дендритные клетки, как правило, представляют собой небольшое тело с множеством длинных древовидных отростков, которые значительно увеличивают площадь их поверхности, тем самым увеличивая эффективную зону для захвата патогенов (рис. 18).

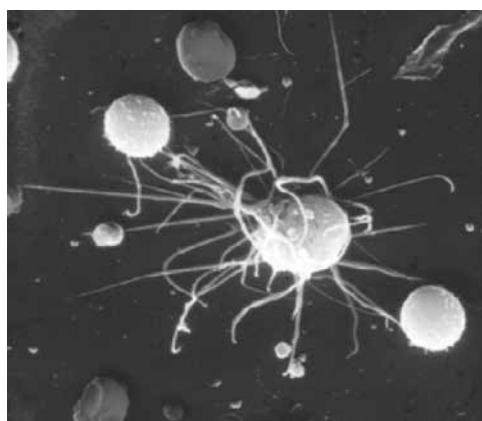


Рис. 18. Дендритная клетка морской свинки.  
Увеличение 1×4000  
(Veterinary Immunology,  
Ian R. Tizard et al., 2018)

Различают несколько субпопуляций дендритных клеток:

– классические ДК – основной тип дендритных клеток, участвующих в захвате белковых антигенов микробов и их последующей презентации Т-клеткам;

– плазматоидные ДК – долгоживущие клетки, быстро реагирующие на заражение вирусами, синтезируют большое количество интерферонов I (ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$ ) и III (ИФН- $\lambda$ ) типов. Играют важную роль в противовирусной защите организма;

– фолликулярные ДК – не презентируют белковые антигены Т-клеткам, но участвуют в активации В-клеток в лимфоидных органах;

– клетки Лангерганса – располагаются в эпидермисе кожи, выполняя функции, аналогичные функциям классических ДК. Они способны к фагоцитозу, но не экспрессируют молекулы костимуляторов B7. Клетки Лангерганса вступают в реакцию с патогеном, если он проникает через поврежденную кожу, мигрируют в ближайший лимфатический узел, там оседают и трансформируются в интердигитальные клетки, экспрессирующие костимуляторы B7.1 и B7.2, что создает условия для включения в ответ CD8 и CD4 Т-клеток [17, 25, 38].

Находясь в тканях, классические дендритные клетки контактируют с патогеном, путем пиноцитоза поглощают его, после чего мигрируют в Т-зону регионарных лимфатических узлов, где созревают, превращаясь в интердигитальные клетки. При этом поглощённый патоген расщепляется до отдельных пептидов, которые экспрессируются на поверхности клетки в составе комплекса пептид-молекула ГКГС I или II класса.

В Т-зоне лимфатических узлов интердигитальные клетки контактируют с Т-клетками. При наличии сродства между комплексом пептид-ГКГС и специфическим антигенраспознавающим рецеп-

тором Т-клетки образуется иммунный синапс и запускается каскад реакций, приводящий к дифференцировке Т-клеток. Одна ДК может активировать до 3000 Т-клеток.

Дендритные клетки могут презентировать захваченный антиген как CD8 Т-клеткам, активируя их дифференцировку в зрелые цитотоксические лимфоциты (CTL), так и CD4 Т-клеткам.

При взаимодействии с CD4 Т-клеткам классические ДК помимо двух сигналов для активации (посредством комплекса антиген-молекула ГКГС II и костимуляторов B7) обеспечивают третий сигнал (посредством различных цитокинов), который направляет дифференцировку наивных CD4 Т-клеток в Th1-, Th2- или Th17-клетки. Некоторые патогены (некоторые вирусы, внутриклеточные бактерии, опухолевые ткани) стимулируют ДК (получившие название подтипа ДК1) секretировать ИЛ-12, который в свою очередь обеспечивает дифференцировку Th1-клеток. Другие патогены (внеклеточные бактерии, паразиты, аллергены)

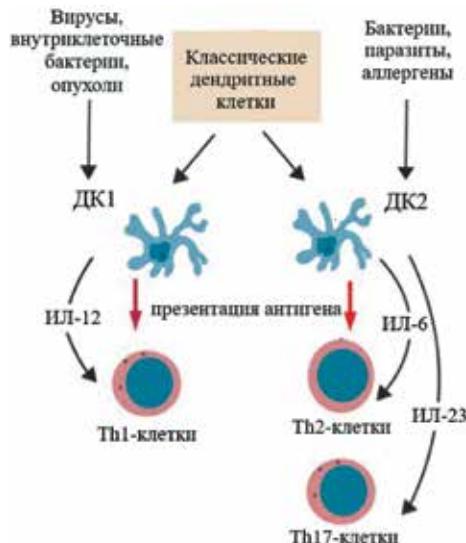


Рис. 19. Направления активации CD4 Т-клеток классическими ДК  
(Veterinary Immunology,  
Ian R. Tizard et al., 2018)

стимулируют ДК (ДК2) к секреции ИЛ-6 или ИЛ-23, провоцируя дифференцировку Th2- или Th17-клеток соответственно (рис. 19).

Дендритные клетки крупного рогатого скота экспрессируют на своей поверхности ГКГС II класса, рецепторы CD80, CD86 и CD40.

У КРС различают две субпопуляции классических дендритных клеток, которые различаются по своей способности стимулировать CD4 и CD8 Т-клетки, поэтому их можно отнести к ДК1 и ДК2.

Также у крупного рогатого скота имеются плазмоцитоидные дендритные клетки, которые способны секретировать большое количество интерферонов I типа [19, 38].

**Макрофаги** захватывают и обрабатывают до иммуногенной формы в основном бактерии и другие корпскулярные антигены. До взаимодействия макрофага с микроорганизмом на его поверхности присутствует очень мало молекул ГКГС II класса и полностью отсутствуют молекулы костимуляторов B7. Один из механизмов захвата и поглощения бактерий связан с наличием у макрофагов рецепторов к маннозе, которые взаимодействуют с углеводами бактериальной стенки. Как только происходит поглощение микроорганизма макрофагом и его деградация в фаголизосомах до отдельных пептидов, начинается активная экспрессия молекул ГКГС II класса и костимуляторов B7 на поверхности макрофага. Возможно, что факторами, индуцирующими экспрессию молекул костимуляторов на поверхности макрофага, являются сигналы, поступающие от его рецепторов, вступивших в контакт с микроорганизмами.

Индукция костимулирующей активности к общим микробным компонентам позволяет иммунной системе отличать бактериальные антигены от собственных антигенов организма.

Имеются исследования, показывающие, что получение иммунного ответа к некоторым белкам возможно только при использовании адьювантов, включающих инактивированные микроорганизмы или компоненты их бактериальной стенки. Возможный механизм развития иммунного ответа в этом случае выглядит следующим образом. Если антигены захватываются и презентируются макрофагами в отсутствии бактериальных компонентов, не происходит экспрессия молекул костимуляторов B7 на их поверхности. Т-клетки специфически распознают комплекс пептид – молекула ГКГС, но остаются рефрактными, поскольку отсутствует второй фактор активации. Полноценное включение в иммунный ответ Т-клеток обеспечивается внесением в систему бактериальных компонентов – индукторов костимуляторов. В условиях эксперимента аутоиммунные заболевания индуцируются смесью собственных тканевых антигенов с компонентами бактериальной стенки [15, 22].

**В-клетки**, как антигенпрезентирующие, активны в отношении белковых антигенов, включая бактериальные токсины. Они имеют поверхностные специфические иммуноглобулиновые рецепторы и обладают выраженной экспрессией молекул ГКГС II класса. Но экспрессия молекул костимуляторов B7, необходимая для полноценной активации Т-клеток, начинается только под влиянием определенных патогенов, таких, например, как полисахариды.

Активация В-клеток происходит после взаимодействия поверхностных специфических иммуноглобулиновых рецепторов с белковым антигеном в результате его эндоцитоза с последующей деградацией в лизосомальных вакуолях. Образующиеся комплексы пептид–ГКГС II класса экспрессируются на поверхности В-клеток. Активатором

синтеза костимуляторов выступают патогены. Таким образом, создаются все условия для вовлечения в ответ CD4 Т-клеток [2, 17].

Кроме того, в определенной степени активацию Т-клеток могут осуществлять другие «непрофессиональные» антигенпрезентирующие клетки, такие как нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, эндотелиальные клетки, фибробласты, натуральные киллеры, клетки гладкой мускулатуры, астроциты, некоторые эпителиальные клетки [38].

### 3.3. Клеточный иммунный ответ

Клеточный иммунный ответ может идти по нескольким (частично взаимопрересекаемым) путям развития, в зависимости от того, какие популяции Т-клеток будут вовлечены – CD8 или CD4.

Т-клетки распознают не собственно антигенный пептид (эпитоп), а его комплекс с молекулой ГКГС I или II класса. Комплекс, который образован при участии молекулы ГКГС I класса, распознается цитотоксическими Т-лимфоцитами – CTL (как правило, имеют маркер CD8). Если комплекс образован при участии молекулы ГКГС II класса, он распознается CD4 Т-клетками.

Если наивные CD4 Т-клетки распознают комплекс на поверхности макрофагов, то они дифференцируются в Th1- или Th2-клетки и в дальнейшем активируют макрофаги к внутриклеточному уничтожению патогена.

Если наивные CD4 Т-клетки распознают комплекс на поверхности В-клеток, то они дифференцируются в хелперные Tfh-клетки (*T follicular helper cells*) и в последующем участвуют в развитии гуморального иммунного ответа (рис. 20) [22, 27].

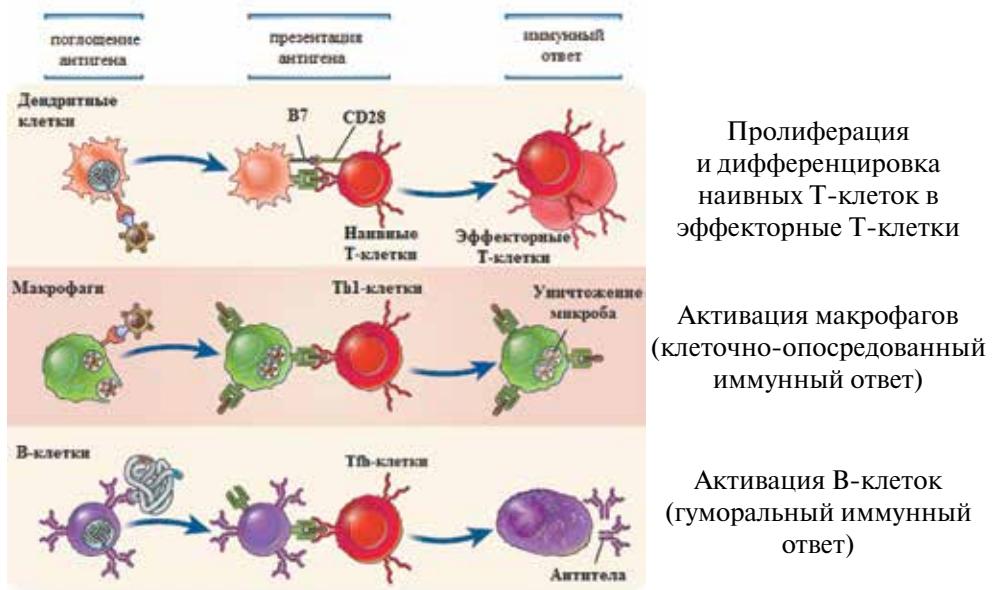


Рис. 20. Функционирование разных типов АПК  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

Важную роль в развитии клеточного иммунного ответа играют Th17-клетки, которые дифференцируются из наивных CD4 в случае, когда организм животного подвергается атаке простых (внеклеточных) патогенов (бактерий, грибов).

Развитие специфического Т- (и В-) клеточного ответа происходит в три основных этапа: распознавание антигена наивными Т-клетками; их пролиферация и дифференцировка до зрелых эффекторов; и собственно эффекторная фаза.

Первая встреча наивных Т-клеток с антигеном происходит в лимфоидной ткани, и именно здесь происходит отбор Т-клеточных клонов по их специфичности к данному антигену. Распознавание антигена наивными Т-клетками происходит с непосредственным участием АПК, при помощи которых и происходит активация (премиорование) наивных Т-клеток, с последующей пролиферацией и диф-

ференцировкой до антигенспецифических клонов [11, 28, 35].

Двухсигнальная активация наивных Т-клеток (взаимодействие комплекса пептид–ГКС с рецептором Т-клетки и взаимодействие костимулирующих молекул Т-клетки и АПК) инициирует полноценный синтез и секрецию IL-2, который аутокринным способом стимулирует наивные Т-клетки к пролиферации и дифференцировке. После пролиферативной фазы эти клетки дифференцируются в зрелые эффекторные Т-клетки, способные синтезировать все компоненты, необходимые для выполнения их специализированных функций.

Прошедшие дифференцировку Т-клетки приобретают способность оказывать прямое эффекторное действие на клетки мишени, без участия каких-либо костимуляторов. Вне зависимости от субпопуляции у всех зрелых Т-клеток происходит ряд изменений поверхностного состава молекул. Усиливается экспрессия адгезинов (LFA-1 и CD2), отвечающих за взаи-

модействие с клетками-мишениями, экспрессирующими чужеродные антигены. Усиливается эффективность прохождения сигнала от антигенраспознавающих рецепторов внутрь клетки. Кроме того, зрелые Т-клетки теряют L-селектин, который был необходим наивным Т-клеткам при заселении лимфоидной ткани. Его экспрессия заменяется другим адгезином — VLA-4, который позволяет Т-клеткам связываться с эпителием сосудов в зоне воспаления [6, 35].

### 3.3.1. CD4 Т-клеточный иммунный ответ

#### Эффекторные функции CD4 Т-клеток

В настоящий момент принято классифицировать 4 подгруппы (субпопу-

ляции) эффекторных CD4 Т-клеток (рис. 21):

- Th1-клетки, основная функция — активация макрофагов к уничтожению внутриклеточных патогенов;
- Th2-клетки играют ключевую роль в борьбе с гельминтными инвазиями;
- Th17-клетки обеспечивают развитие воспаления на месте внедрения патогена с привлечением большого количества нейтрофилов, реже моноцитов;
- Tfh-клетки (фоликулярные хелперные Т-клетки) осуществляют активацию В-клеток, соответственно развитие гуморального иммунного ответа.

Такое разделение CD4 Т-клеток на подгруппы связано с набором цитокинов, которые они синтезируют, и функциями, которые данные клетки выполняют.

эффекторные определяющие Т-клетки	цитокины	основные клетки мишени	преобладающая иммунная реакция	защита направлена против
Th1	ИНФ-γ	Макрофаги	активация макрофагов (классический путь)	внутриклеточные патогены
Th2	ИЛ-4 ИЛ-5 ИЛ-13	Эозинофилы	активация эозинофилов и тучных клеток, активация макрофагов (альтернативный путь)	гельминты
Th17	ИЛ-17 ИЛ-22	Нейтрофилы	активация и привлечение в зону воспаления нейтрофилов	внеклеточные патогены (бактерии и грибы)
Tfh	ИЛ-21 ИНФ-γ или ИЛ-4	В-клетки	активация В-клеток, развитие гуморального иммунного ответа	внеклеточные патогены

Рис. 21. Основные субпопуляции CD4 Т-клеток  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

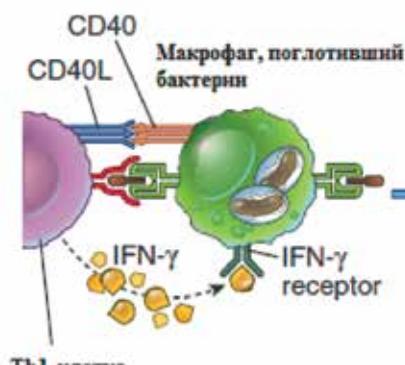
CD4 Т-клетки, выйдя из тимуса, еще не могут дифференцироваться до зрелых эффекторных клеток. Для этого они проходят дополнительный этап развития во вторичных лимфоидных органах, где превращаются в незрелые Th0-клетки, из которых в дальнейшем формируются зрелые эффекторные CD4 Т-клетки. При этом Th1-, Th2- и Th17-клетки покидают вторичные лимфоидные органы (лимфатические узлы, селезенку), перемещаясь на периферию, где и осуществляют свою функцию. Часть эффекторных CD4 Т-клеток (Tfh — *T follicular helper cells*) после созревания не выходят из вторичных лимфоидных органов после контакта с АПК, презентирующими антиген, они активируются и перемещаются в лимфоидные фолликулы внутри органов, где в последующем участвуют в развитии гуморального иммунного ответа.

Развитие типа субпопуляции эффекторных CD4 Т-клеток зависит от типа патогена, в ответ на который они диф-

ференцируются. Каждая субпопуляция дифференцированных эффекторных CD4 Т-клеток продуцирует цитокины, которые подавляют развитие других подгрупп [11, 15, 22, 28, 38].

**Th1-клетки.** Некоторые бактерии и вирусы (возбудители туберкулеза, чумы и др.) способны выживать и активно размножаться внутри макрофагов. Локализуясь в макрофагальных фаголизосомах, они не подвергаются лизису и становятся защищенными от действия антител и цитотоксических Т-клеток (CTL). Борьба с такого рода патогенами осуществляется при активном участии Th1-клеток, которые усиливают лизосомальную активность самих макрофагов. Для активации макрофагов требуется два сигнала: ИНФ- $\gamma$  и фактор некроза опухолей (рецептор CD40 на поверхности макрофага и лиганд CD40L на поверхности Th1-клетки), которые активно секретируют Th1-клетки, распознавшие на поверхности макрофагов патоген (рис. 22).

### Активация макрофагов



### Ответ активированных макрофагов

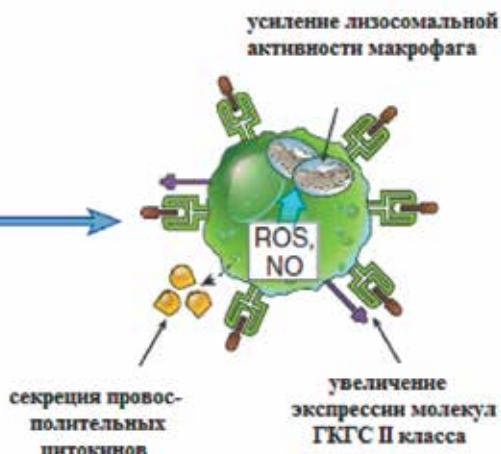


Рис. 22. Активация макрофагов Th1-клетками  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

В результате такой активации инициируется ряд биохимических изменений, которые обеспечивают макрофагам сильные противомикробные свойства. Происходит более эффективное слияние фагосом, захвативших патоген, с лизосомами. Процесс фагоцитоза сопровождается кислородным взрывом — образованием кислородных радикалов и окиси азота. Кроме того, активированные макрофаги увеличивают экспрессию молекул ГКГС II класса и рецепторов для фактора некроза опухолей, что обеспечивает вовлечение дополнительных Т-клеток. Активированные макрофагами Th1-клетки вовлекают дополнительные эффекторы, посредством секреции IL-12, который способствует пролиферации и дифференцировке антигенспецифических Т-клеток [22, 31].

Активация макрофагов Th1-клетками получила название классического пути активации [11, 22, 28, 38].

**Th2-клетки.** Th2-клетки являются активаторами фагоцит-независимой защиты, направленной на борьбу с гельминтными инвазиями, а также на устранение других патогенов в тканях слизистых оболочек, в которых основную роль играют эозинофилы и тучные клетки.

Наиболее значимыми цитокинами, которые направляют развитие CD4 Т-клеток в зрелые Th2-клетки, являются ИЛ-4, ИЛ-25, ИЛ-35, продуцируемые тучными клетками и самими Th2-клетками.

В свою очередь, активированные Th2-клетки начинают секретировать цитокины, которые влияют на развитие иммунного ответа (рис. 23).

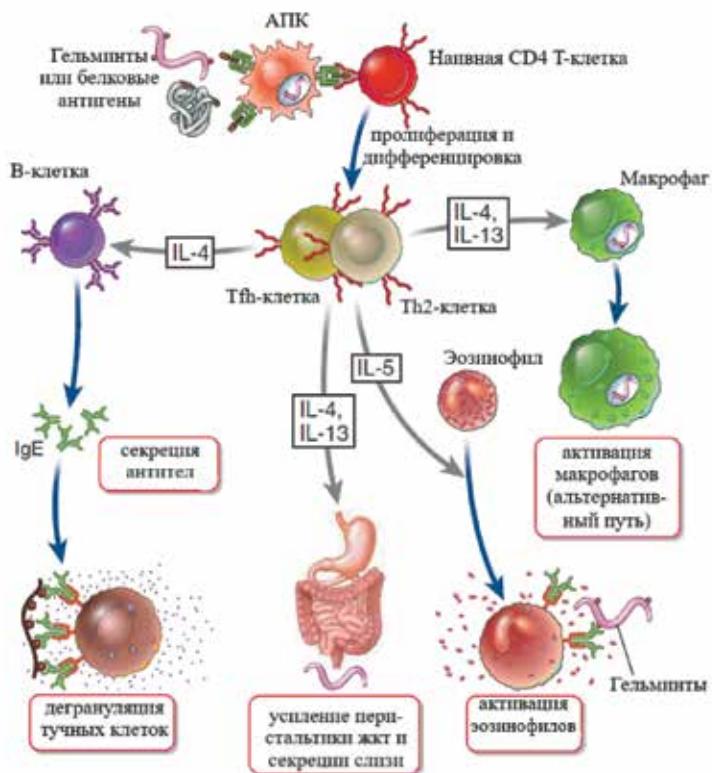


Рис. 23. Функции Th2-клеток (Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

ИЛ-4 и ИЛ-13 активируют макрофаги (альтернативный путь активации макрофагов) к уничтожению внутриклеточных паразитов, а также к выработке цитокинов, инициирующих восстановление тканей после различных повреждений. Как и активированные макрофаги, Th2-клетки сами по себе вызывают рубцевание тканей и фиброз, выделяя факторы роста, стимулирующие пролиферацию фибробластов, синтез коллагена, образование новых кровеносных сосудов.

ИЛ-4 и ИЛ-13, кроме того, активируют выработку слизи (на поверхности слизистых оболочек пищеварительного тракта и дыхательных путей) и перистальтику кишечника, тем самым затрудняя проникновение/прикрепление новых гельминтов и ускоряя избавление от них.

ИЛ-5 активирует эозинофилы к уничтожению гельминтов.

При развитии адаптивного иммунного ответа к гельминтам в работу включаются также Tfh-клетки, секретирующие ИЛ-4, который в свою очередь вызывает переключение плазматических клеток на синтез антител класса Е (IgE), играющих важную роль в борьбе с паразитами [11, 19, 22, 28, 38].

**Th17-клетки.** На дифференцировку CD4 Т-клеток в зрелые Th17-клетки наибольшее влияние оказывают цитокины ИЛ-6, ИЛ-1 и ИЛ-23, которые продуцируются в ответ на воспалительную реакцию, вызванную различными бактериями и грибами.

Th17-клетки в большом количестве присутствуют в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, играя важную роль в развитии защиты на пути проникновения инфекции со стороны пищеварительного тракта.

Одним из основных цитокинов, посредством которого Th17-клетки участвуют в развитии иммунологических реакций, является ИЛ-17. Данный ци-

токин опосредует развитие воспаления на месте внедрения патогена с привлечением большого количества нейтрофилов (нейтрофильное воспаление), реже моноцитов. Нейтрофилы являются основным клеточным компонентом борьбы с подавляющим большинством простых патогенов (бактерий и грибов).

Кроме того, ИЛ-17 стимулирует многие типы клеток организма животного на выработку antimикробных веществ, в т.ч. дефензинов (рис. 24).

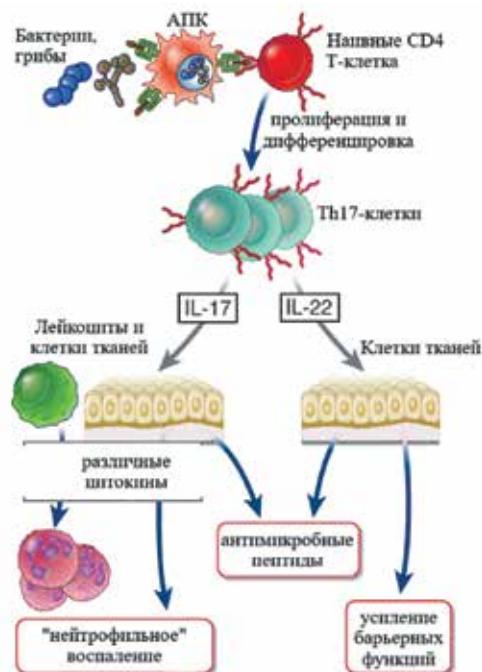


Рис. 24. Функции Th17-клеток  
(Cellular and Molecular Immunology,  
Abul K. Abbas et al., 2017)

ИЛ-22, продуцируемый Th17-клетками, стимулирует процессы восстановления и поддержания барьерной функции кожи и слизистых оболочек, особенно пищеварительного тракта. Также индуцирует синтез разнообразных antimикробных пептидов.

ИЛ-21 активирует В-клетки в зародышевых центрах лимфоидных органов [11, 22, 38].

### 3.3.2. CD8 Т-клеточный иммунный ответ

#### Активация наивных CD8 Т-клеток

Имеются три пути активации дифференцировки наивных CD8 Т-клеток в зрелые CTL (*Cytotoxic T-lymphocytes* — цитотоксические Т-лимфоциты):

— взаимодействие с дендритными клетками, характеризующимися выраженной экспрессией костимуляторов B7.1 и B7.2, что достаточно для инициации синтеза IL-2, который обеспечивает пролиферацию и дифференцировку наивных Т-клеток по аутокринному пути стимуляции;

— если вирусные антигены обладают недостаточной иммуногенностью для формирования сигнала от Т-клеточного рецептора или вызывают низкую экс-

прессию костимуляторов B7, то требуется включение в иммунный ответ CD4 Т-клеток. Эти клетки способны стимулировать АПК к синтезу костимуляторов B7, создавая нормальные условия для активации наивных CD8 Т-клеток;

— прямое действие на наивные CD8 Т-клетки IL-2, который секретируется распознавшими антиген CD4 Т-клетками. Этот способ проявляется в условиях, когда CD8 Т-клетки распознают иммуногенный комплекс на поверхности клеток, не способных экспрессировать костимуляторы B7 [15, 19, 22].

#### Эффекторное действие цитотоксических лимфоцитов (CTL)

Вирусы, паразитируя внутри клетки, остаются недоступными для нейтрализующего действия антител до тех пор,

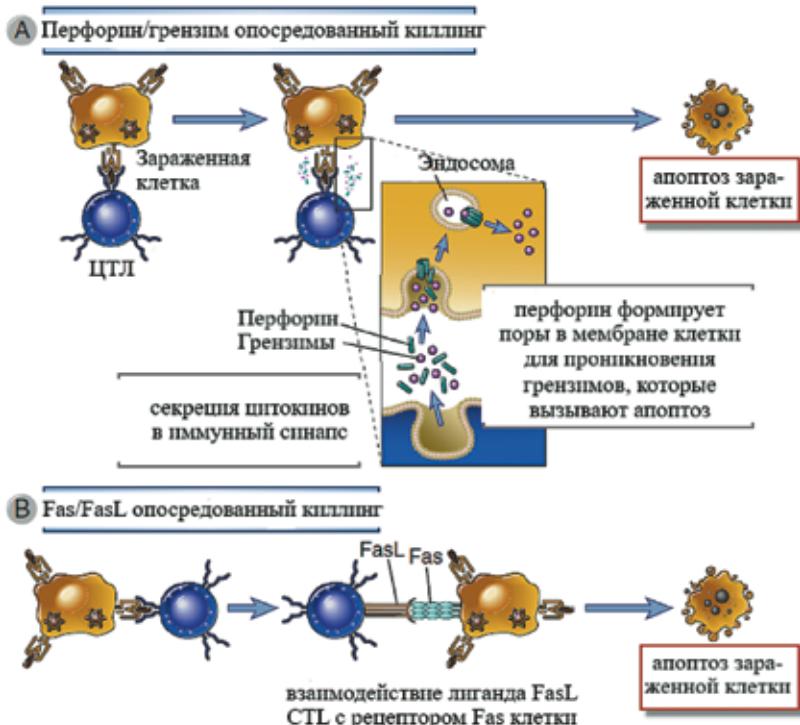


Рис. 25. Эффекторное действие цитотоксических лимфоцитов (CTL) (Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

пока они не выходят во внешнюю среду. Поэтому основным фактором борьбы с вирусными патогенами являются CTL. Они распознают клетки, пораженные вирусом, и уничтожают их по одному из двух путей: секреция цитотоксических веществ или передача цитотоксического сигнала, вызывающего апоптоз клетки (*рис. 25*).

CTL, распознав инфицированную клетку, связываются с ней, при этом между клетками образуется микрополость, в которую CTL секретирует белки, получившие название цитотоксинов. Наиболее значимыми из них являются:

- перфорин — образует поры в мембране клетки-мишени для прохождения гранзимов;
- гранзимы (фрагменты) — обладают свойствами пищеварительных ферментов, которые обусловливают апоптоз инфицированной клетки.

После запуска цитолиза CTL отделяются от клеток-мишеней и снова поступают в кровяное русло, где могут выполнять свое функциональное предназначение [6, 19, 22].

CTL могут запускать процесс апоптоза инфицированных клеток, воздействуя через поверхностные рецепторы: FasL (Fas-лиганд) на поверхности CTL и Fas-рецептор (CD95, содержит домен смерти) на поверхности клетки-мишени. Аналогичным образом апоптоз клетки-мишени может быть запущен через рецепторы к фактору некроза опухолей.

CTL, специфически распознавшие антиген, начинают секретировать IFN- $\gamma$ , который оказывает прямое ингибирующее действие на размножение вирусов. Кроме того, ИНФ- $\gamma$  увеличивает экспрессию молекул ГКГС I класса на поверхности инфицированных клеток, что облегчает распознавание таких клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Помимо этого, ИНФ- $\gamma$  активирует макрофаги, усиливает их миграцию в зону

проникновения вирусов, где они функционируют и как эффекторные клетки, и как АПК.

После завершения цитотоксического иммунного ответа большая часть CTL подвергается апоптозу, при этом формируется популяция CD8 T-клеток памяти [6, 11, 22].

### 3.4. Гуморальный иммунный ответ

Патогены, оказавшись во внеклеточной среде организма хозяина, подвергаются воздействию антител — эффекторных молекул, продуцируемых В-клетками (плазматическими клетками).

Поверхностный иммуноглобулин (sIg) В-клеток выполняет несколько функций при их трансформации в антителопродуцирующие плазмоциты. Он обеспечивает передачу сигнала о встрече с антигеном внутрь клетки. Также sIg В-клеток является фактором захвата и транспортировки этого антигена внутрь клетки, где происходит его деградация до отдельных пептидов, с последующей их экспрессией на поверхности клетки в составе комплекса с молекулами ГКГС II класса. Этот комплекс в последующем распознается CD4 T-клетками.

Большинство антигенов являются тимусзависимыми, и для полноценного развития гуморального ответа, помимо сигнала, полученного от непосредственного контакта с антигеном, В-клеткам необходим второй активирующий сигнал от Tfh-клеток. В условиях реальной инфекции Т- и В-клетки распознают один и тот же комплексный антиген, но зачастую разные его эпигенотипы. Данное явление получило название сцепленного распознавания антигена. SIg В-клетки, специфиче-

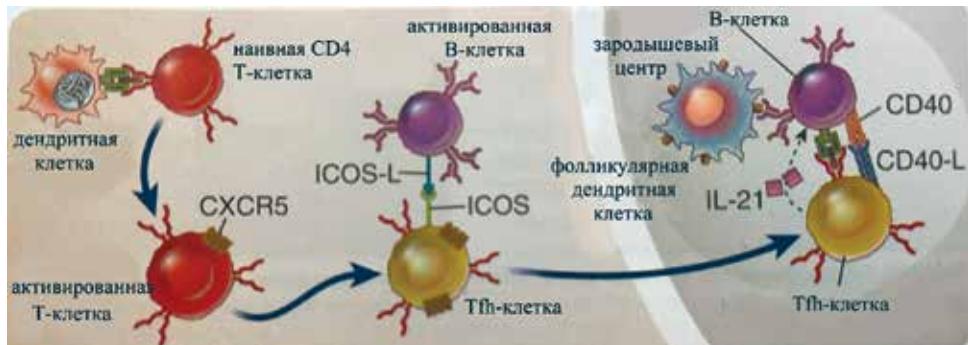


Рис. 26. Развитие и функция Tfh-клеток

(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

ски взаимодействуя с поверхностным эпипотом антигена, обеспечивают его захват и перемещение внутрь клетки. В результате последующей переработки антигена и экспрессии его отдельных пептидов в составе комплекса с молекулами ГКГС II класса на поверхности могут оказаться как внешние, так и внутренние эпипоты антигена. CD4 Т-клетки, специфически взаимодействовав с этим комплексом, подвергаются пролиферации и дифференцировке в антигенспецифические Tfh-клетки, которые в дальнейшем, контактируя с антигенспецифическими В-клетками, обеспечивают им

второй сигнал для дифференцировки в антителопродуцирующие плазмоциты. Но при этом специфичность производимых антител будет только к поверхностному эпипоту антигена, с которым был первоначальный контакт В-клетки [11, 19, 35].

В свою очередь, для того чтобы наивные CD4 Т-клетки дифференцировались в Tfh-клетки, им также необходим двойной контакт: первый — начальная активация дендритными клетками, поглотившими антиген; второй — последующая активация В-клетками, контактировавшими с антигеном, как АПК (рис. 26).

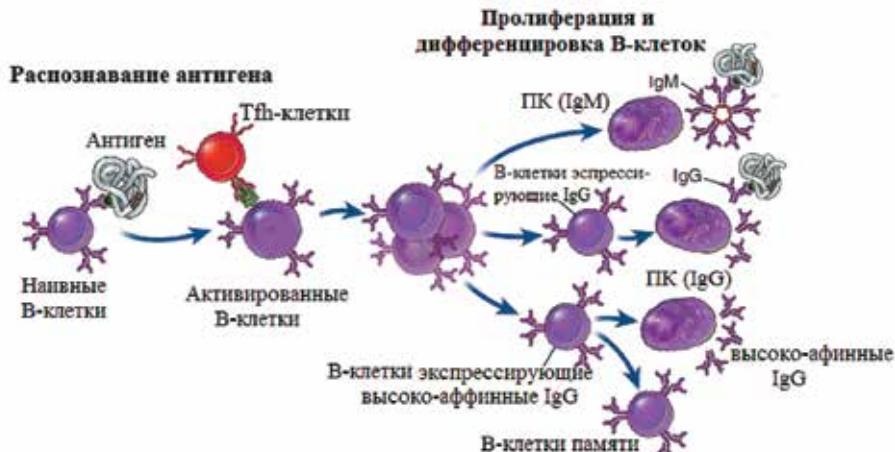


Рис. 27. Фазы гуморального иммунного ответа

(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

Дифференцировка активированных В-клеток проходит в зародышевых центрах при участии фолликулярных дендритных клеток и специфических Tfh-клеток, последние продуцируют мембранные и секреторные факторы активации, наиболее важные из них — рецептор CD40L-лиганд, контактирующий с соответствующим рецептором В-клетки (CD40), а также ИЛ-21.

В дальнейшем по мере развития эфекторной фазы происходит ряд изменений в процессе синтеза антител (рис. 27).

Во-первых, происходит переключение синтеза антител с одного изотипа на другой. В начале развития гуморального ответа преимущественно синтезируются низкоспецифические IgM, а в дальнейшем они замещаются синтезом более специфических IgG, IgA и IgE и формированием клеток памяти. Этот процесс происходит при участии цитокинов, продуцируемых Tfh-клетками.

Во-вторых, в ходе развития гуморального иммунного ответа происходит увеличение аффинности (сродства) синтезируемых антител [15, 21].

На рисунке приведена схема активации, пролиферации и дифференцировки В-клеток до антителосекретирующих плазматических клеток (ПК). Вначале секreтируются IgM, затем более специфические IgG, в дальнейшем аффинность IgG повышается. Также в процессе гуморального иммунного ответа формируются В-клетки памяти.

### Эффекторная функция В-системы

Свою эффекторную функцию В-система иммунитета выполняет при помощи синтезируемых антител, и проявляется она в трех формах: нейтрализации, опсонизации и активации системы комплемента (рис. 28) [11, 19, 22, 35].

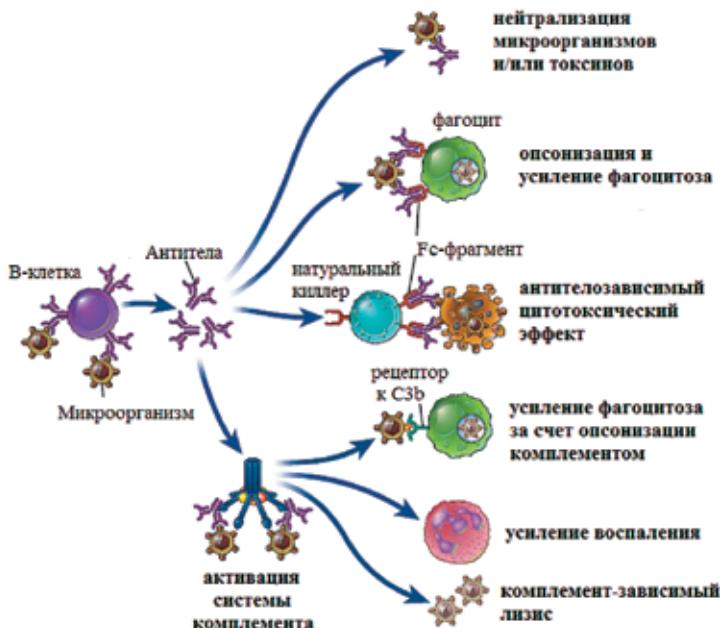


Рис. 28. Эффекторная функция антител  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

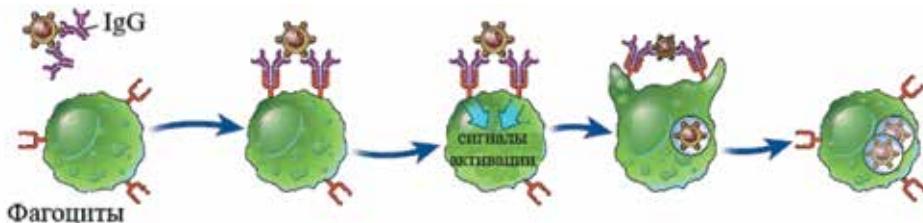


Рис. 29. Антител-опосредованная опсонизация и фагоцитоз  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

**Нейтрализующее действие** антител связано с их блокировкой рецепторного взаимодействия патогена с инфицируемой клеткой организма хозяина. Нейтрализующее действие антител проявляется не только в отношении корпускулярных антигенов, но и в отношении отдельных молекул (например бактериальных токсинов).

**Опсонизация.** Процесс фагоцитоза антигена макрофагами может быть усилен за счет участия специфических антител. Макрофаги имеют на своей поверхности рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов. Антитела, специфически связавшись с патогеном, делают его намного более доступным для фагоцитирующих клеток за счет взаимодействия Fc-фрагментов антител и рецепторов к Fc-фрагментам на поверхности фагоцитов. При этом фагоциты взаимодействуют только с антителами, вступившими в специфическое взаимодействие с антигеном, за счет конформационного изменения Fc-фрагментов, вступивших в

контакт антител, а также за счет агрегации значительного количества антител на одном патогене (рис. 29).

В процессе опсонизации участвуют не только фагоциты, но и другие иммунологически активные клетки. Так, натуральные киллеры также имеют рецептор к Fc-фрагментам иммуноглобулинов и участвуют в уничтожении вирус-инфицированных клеток (рис. 30) [11, 19, 22, 28, 38].

**Активация системы комплемента.** Антитела, связавшись с патогеном, могут активировать белки системы комплемента, которые участвуют в ряде иммунологических процессов. Они могут выполнять роль опсонинов для некоторых патогенов и/или функционировать как хемоаттрактанты, привлекая в зону проникновения патогена фагоцитирующие клетки, либо могут проявлять литическую активность, образуя поры в стенке бактерий, вызывая тем самым их гибель (рис. 7) [2, 11, 19, 22, 35].

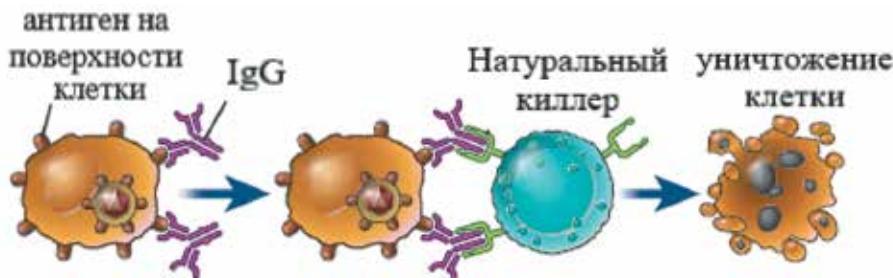


Рис. 30. Антител-зависимое уничтожение инфицированных клеток натуральными киллерами  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

**Таблица 2. Концентрация\* иммуноглобулинов в сыворотке крови и секретах крупного рогатого скота, мг/мл**

Биологическая жидкость	IgG1	IgG2	IgM
Сыворотка крови	6,0–15,1	5,0–13,5	0,6–4,3
Молозиво	30,0–75,0	1,9–4,0	3,2–12,1
Молоко	0,33–1,2	0,037–0,06	0,037–0,15
Носовые секреты	1,56	нет данных	0,23–0,56
Слюна	0,017–0,050	0,01–0,02	0,002–0,01
Слезы	0,13–0,54	0,01–0,13	0,176
Моча	0,009	следы	следы
Желчь	0,10	0,09	0,05
Вагинальный секрет	0,23	0,13	нет данных
Бронховоальвеолярная жидкость	0,13	0,24	0,03
Синовиальная жидкость	2,02	1,20	0,37
Кишечная жидкость	0,25	0,06	следы
Сперма	0,13	0,11	следы

\* В таблице приведены усредненные данные. Уровень иммуноглобулинов может значительно варьировать в зависимости от породы, возраста, времени года, состояния стельности, фазы лактации и пр.

У крупного рогатого скота синтезируются следующие классы (и подклассы) иммуноглобулинов: IgM (M1 и M2), IgG (G1, G2 и G3), IgA, IgE и IgD. При этом наблюдаются значительные сезонные различия в уровне разных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови, однако усредненные показатели следующие (мг/мл): IgM 2,5–4,0; IgG 17–27; IgA 0,1–0,55 [38].

Подкласс IgG1 составляет около 50% сывороточного IgG и является преобладающим иммуноглобулином в коровьем молоке и молозиве (в отличие от многих других животных, у которых в молоке и молозиве преобладает IgA). Это связано с селективным переносом IgG из кровотока в молочную железу. Однако во многих слизистых оболочках IgA остается преобладающим, несмотря на то, что IgG1 также присутствует. IgG играет более важную роль в защите дыхательных путей (по сравнению с пищеварительным трактом), поскольку там они с меньшей вероятностью могут быть подвергнуты воздействию протеаз.

Уровень IgG2 в сыворотке крови КРС является наследственным фактором, и

его концентрация сильно варьирует у разных животных. Только для крупного рогатого скота характерно наличие уникального рецептора к Fc участку IgG2 на поверхности своих макрофагов и нейтрофилов [38].

IgM крупного рогатого скота существует в пентамерной форме и состоит из пяти мономеров, каждый из которых включает четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H-цепи) и две легкие (L-цепи). Мономеры объединены в единую молекулу дисульфидными связями и J-цепью, которая требуется для корректировки пентамерной структуры.

Уровень иммуноглобулинов IgG1, IgG2 и IgM в разных биологических жидкостях КРС представлен в табл. 2.

IgA является преобладающим в составе серозно-слизистых секретов, таких как слезная жидкость, слюна, носовая слизь, слизь дыхательных и мочеполовых путей. Данный тип иммуноглобулинов обладает рядом специфических свойств, позволяющих ему выполнять защитные функции на поверхности слизистых оболочек:

- высокая устойчивость к протеазам;
- неспособность связывать компоненты комплемента, что ведет к отсутствию повреждающего действия комплекса антиген–антитело на слизистые;
- способность препятствовать адгезии микроорганизмов, их токсинов, пищевых и бактериальных аллергенов на эпителий слизистых оболочек, что блокирует их проникновение во внутреннюю среду организма [1, 36].

Усредненные показатели уровня IgA в разных биологических жидкостях КРС представлены на рис. 31 [38].

IgE крупного рогатого скота представляет собой мономер, включающий две тяжелые и две легкие цепи. Содержание IgE в сыворотке крови крайне мало, хотя удельный вес этих иммуноглобулинов в аллергических реакциях является доминирующим. Функциональная активность IgE проявляется в развитии аллергических реакций. Данный иммуноглобулин взаимодействует с тучными клетками и базофилами по-

средством Fc-области и соответствующего рецептора на этих клетках [1, 36].

#### 4. Органы иммунной системы

В иммунной системе млекопитающих можно выделить три основные группы органов:

- центральные (тимус и красный костный мозг);
- периферические органы иммунитета, расположенные на путях циркуляции крови и лимфы (селезенка и многочисленные лимфатические узлы);
- лимфоидная ткань и лимфоидные органы, расположенные на границе организма с внешней средой (миндалины, лимфоидные бляшки и пр.).

Органы иммунной системы постоянно взаимосвязаны между собой циркулирующими лимфоцитами, которые выполняют функции поиска, обнаружения и уничтожения патогенов.

Лимфоциты по своим функциям и строению подразделяются на две главные клеточные линии. Первая из них

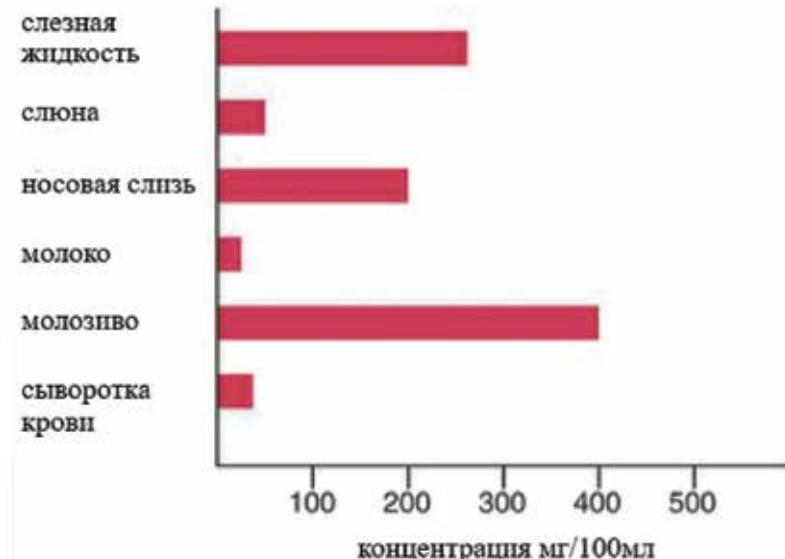


Рис. 31. Уровень IgA в разных биологических жидкостях КРС  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

представлена Т-лимфоцитами (Т-клетками), которые обеспечивают клеточную форму иммунного реагирования — цитотоксическое разрушение генетически отличающихся клеток и тканей, а также участвуют в регуляции как клеточного, так и гуморального иммунного ответа посредством включения в иммунный процесс Т-хелперов. Вторая клеточная линия представлена системой В-лимфоцитов (В-клеток), обеспечивающей реакции гуморального иммунитета.

Основой паренхимы органов иммунопоэза является лимфоидная ткань, которая в центральных органах дифференцируется на корковую и мозговую зоны, а в периферических — на диффузные скопления и лимфоидные узелки. Для органов иммунной системы характерна сегментарность строения, которая проявляется в упорядочении их внутренней организации и направлена на интенсификацию выполняемой ими функции. К моменту рождения у млекопитающих в основном сформированы только центральные органы иммунопоэза, а периферические наиболее активно начинают формироваться в молочный (ювенильный) период под воздействием антигенов внешней среды. Для органов иммунопоэза характерна ранняя возрастная инволюция, то есть обратное развитие, которое начинается в период полового созревания организма и проявляется в замещении лимфоидной ткани жировой и соединительной. При этом относительное уменьшение массы лимфоидной ткани компенсируется ее зрелостью [1, 2, 22, 26].

### **Первичные и вторичные лимфоидные органы и ткани**

Центральные органы иммунной системы — костный мозг и тимус, из них лимфоциты по кровеносным сосудам мигрируют в периферические органы:

селезенку, лимфатические узлы, лимфоидную ткань, ассоцииированную с желудочно-кишечным и дыхательным трактами. Лимфатические сосуды, пронизывающие все тело, собирают лимфоциты из внеклеточной жидкости в лимфатические узлы. Оказавшиеся в лимфоузлах клетки по эfferентным сосудам поступают в основной лимфатический сосуд — грудной проток, из которого они вновь проникают в кровь через подключичную вену [1, 11].

**Красный костный мозг** является одновременно органом кроветворения и органом иммунной системы. В петлях его стromы располагается миелоидная ткань. Между островками клеток гемопоэтического ряда расположены скопления костномозговых лимфоцитов, концентрирующихся вокруг кровеносных сосудов. Они представлены В-лимфоцитами и предшественниками Т-лимфоцитов. В костном мозге лимфоциты составляют 3–17% от числа всех ядросодержащих клеток [1, 22, 38].

**Тимус** крупного рогатого скота состоит из двух долей: грудной и шейной, которые расположены впереди сердца и нижней части шеи соответственно. В онтогенезе тимус у плода крупного рогатого скота появляется на 30–40-й день, а селезенка и лимфатические узлы — на 55-й день. Тимус — главное место созревания Т-клеток, и этот процесс последовательно совершается в коре и медулле, в последней осуществляется развитие более зрелых популяций. Кроме того, эпителиоретикулоциты тимуса, которые представлены в большей степени в мозговом слое, секретируют гуморальные факторы, регулирующие иммунологические процессы: тимозин, Т-активин, тимарин, тимопоэтин, тимостимулин, сывороточный и гуморальный тимусные факторы. Т-клетки (97%) и дендритные клетки (3%) являются главными иммунными клеточными популяциями тимуса.

Лимфатические узлы расположены на пути оттока лимфы от органов и тканей к грудному лимфатическому протоку, который впадает в кровеносную систему, что обеспечивает рециркуляцию лимфоцитов. Лимфатические узлы у крупного рогатого скота сходны по структурной организации с таковыми у мышей и человека, в них различают корковый слой (кортекс), расположенный по периферии и организованный в первичные и вторичные фолликулы, паракортикальную область и мозговое вещество (медуллу), находящееся в центре узла. В кортексе содержатся скопления В-клеток, образующих первичные и вторичные фолликулы. Фолликулярная область преобладает в коре лимфатических узлов. В фолликулах содержится большая часть В-клеток. Эта область содержит некоторое количество CD4 и CD8 Т-клеток. До 70% фолликулов лимфатических узлов у здоровых 6–12-месячных животных содержат зародышевые центры, которые в значительной степени составлены из пролиферирующих В-клеток и фолликулярных дендритных клеток, отличающихся от дендритных клеток, активирующих Т-клетки, способностью длительного сохранения нативного антигена на своей поверхности. В зародышевых центрах происходит взаимодействие антигенспецифических В-клеток с презентирующими антиген фолликулярными дендритными клетками, что ведет к образованию активированных клеток, которые перемещаются на периферию фолликула, где трансформируются в плазмоциты, синтезирующие антитела, или образуют клетки памяти [1, 22, 38].

**Селезенка** крупного рогатого скота является большим инкапсулированным органом, расположенным на дорсальной поверхности, в ней различают два основных типа ткани: красную и

белую пульпу. Белая пульпа состоит из лимфоидной ткани, образующей вокруг артериол периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) с селезеночными узелками; красная пульпа состоит из синусоидов селезенки, тяжей селезенки (тяжи Бильрота) и содержащейся в них крови.

CD4, CD8 Т-клетки и встречающиеся дендритные клетки базируются внутри или в периартериолярной зоне лимфоидных муфт, в то время как первичные и зародышевые центры, содержащие В-клеточные фолликулы, локализуются снаружи ПАЛМ. Лимфоидная муфта окружена маргинальной зоной, которая разделена на маргинальные синусы. Маргинальная зона заселена В-клетками, макрофагами и Т-клетками. Как и в лимфатическом узле, фолликулярные дендритные клетки базируются в зародышевых центрах, В-клеточные фолликулы содержат некоторое количество CD4 Т-клеток и небольшое количество CD8 Т-клеток [1, 22, 38].

**Лимфоидная ткань, ассоциированная с желудочно-кишечным трактом (GALT – gut-associated lymphoid tissue).** Иммунная система желудочно-кишечного тракта характеризуется рядом особенностей, несколько отличающих ее от других периферических органов иммунитета. Она появляется значительно раньше, чем другие органы иммунной системы. Более того, центральные органы иммунной системы в онтогенезе формируются из кишечной ткани, например, тимус — из 3-го и 4-го глоточных карманов. Другой особенностью иммунной системы ЖКТ является то, что она находится в тесном контакте с громадным потоком микробного и аллергенного материала, поступающего из просвета кишечника, и практически служит первым барьером на пути этого потока.

GALT образована скоплениями лимфоидных структур в слизистой и под-

слизистой оболочках кишечника, получивших название пейеровы бляшки (*Peter's patches* — PP), отдельными узелками собственной пластиинки (*Lamina propria*) и лимфоцитами, распределенными в собственной пластиинке и между эпителиальными клетками слизистой.

Пейнеровой бляшкой принято считать группу из 5 расположенных вместе лимфоидных узелков. Новорожденный теленок имеет приблизительно 76 отдельных PP в двенадцатиперстной, тощей и ободочной кишках и непрерывные PP в подвздошной кишке. При половом созревании (к 18 месяцам) последние исчезают, а 18–40 отдельных PP остаются видимыми у взрослого крупного рогатого скота.

Условно в иммунной системе желудочно-кишечного тракта можно выделить индуктивную и эффекторную зоны. Первая состоит из PP, аппендикса и регионарных лимфатических узлов; вторая — из собственной пластиинки (*Lamina propria*) и эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника. В индуктивной зоне происходят распознавание, презентация антигена и формирование популяции антиген-специфических Т- и В-клеток; в эффекторной зоне — синтез иммуноглобулинов и различных цитокинов.

Пейнеровы бляшки играют важную роль в иммунной системе желудочно-кишечного тракта. Они, как и любые лимфоидные образования, состоят из Т- и В-зон с наличием зародышевых центров в В-зоне. Для них характерна уникальная морфологическая структура — фолликулярно-ассоциированный эпителий, главной чертой которого является М-клетка. Эта клетка имеет короткие цитоплазматические отростки и образует интраэпителиальный карман, в котором, помимо самой М-клетки, находятся макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты [1, 22, 38].

## 5. Защитные механизмы поверхностей тела

Млекопитающие в процессе эволюции приобрели обширный набор механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответов. Однако подавляющая часть патогенных микроорганизмов не могут преодолеть защитные функции поверхностей тела, т.е. инфекционная угроза нейтрализуется еще до того, как потенциальные патогены проникают в организм животного.

Наиболее очевидным барьером на пути микроорганизмов является кожа, хотя поверхность слизистых оболочек (дыхательных путей, пищеварительного тракта, урогенитальной системы, глаз) является минимум в 200 раз больше, чем площадь кожного покрова. Именно поэтому инфекционные заболевания органов дыхания и пищеварения являются основной причиной снижения показателей продуктивности и гибели молодняка животных [11, 22, 38].

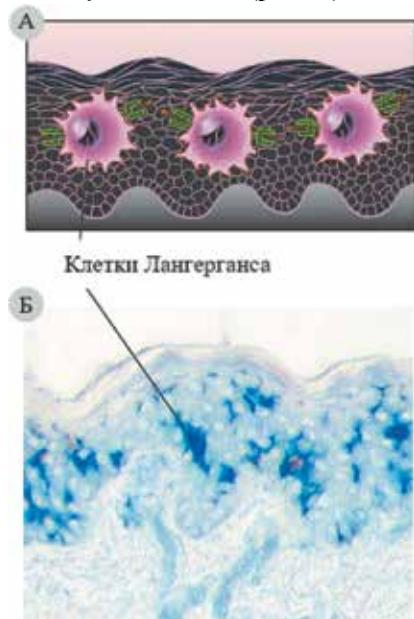
### Кожа

Здоровая кожа эффективно выполняет свои защитно-барьерные функции и является непреодолимым препятствием для подавляющего числа патогенных микроорганизмов. Кожа представляет собой плотный физический барьер, поверхность которого постоянно обновляется (за счет слущивания эпителия), на ее поверхности создаются неблагоприятные уровни pH и влажности (за счет жирных кислот и кожного сала), кроме того, она заселена резидентной (сапрофитной) микрофлорой, которая в процессе своей жизнедеятельности создает неблагоприятные условия для патогенной микрофлоры.

Каждый слой кожи имеет свои защитные механизмы. Кератиноциты (основ-

ные клетки эпидермиса) экспрессируют многие паттерн-распознающие рецепторы (TLR, рецепторы маннозы, лектины и др.) для распознавания патогенассоциированных молекулярных паттерн (ПАМП) микроорганизмов. При активации данных рецепторов кератиноциты начинают выделять различные цитокины (интерлейкины, интерфероны, хемокины), белки с антимикробной активностью, которые помогают бороться с патогенами.

Если микробам удается проникнуть в кожу, пройдя роговой слой эпидермиса, они сталкиваются с предшественниками дендритных клеток — клетками Лангерганса, которые являются очень эффективными антигенпрезентирующими клетками, запуская механизмы адаптивного иммунного ответа (*рис. 32*).



**Рис. 32. Клетки Лангерганса в эпидермисе (CTL)**  
(*Cellular and Molecular Immunology*,  
Abul K. Abbas et al., 2017). А — клетки  
Лангерганса в коже (схематичное  
изображение); Б — клетки Лангерганса  
(синего цвета), окрашенные при помощи  
специфических антител с коньюгатом  
(иммуноферментное окрашивание)

В базальном слое эпидермиса и в дерме присутствуют разные типы хелперных Т-клеток, выполняющих свои специализированные функции. Особую роль играют Th17-клетки, продуцирующие в том числе ИЛ-22, который стимулирует процессы восстановления и поддержания барьерной функции кожи, а также синтез разнообразных антимикробных пептидов [11, 22, 38].

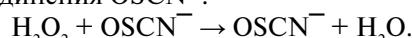
### Молочная железа

Большинство инфекционных заболеваний молочной железы происходит в результате проникновения патогенной микрофлоры через канал соска в цистерну соска и дальше в ткани молочной железы. У нелактирующих животных кератиновая пробка закрывает канал соска, тем самым препятствуя проникновению патогенов.

У лактирующих животных в защите молочной железы принимают участие следующие факторы: промывающее действие молока; наличие в молоке антимикробных веществ (лактоферрин, лактопероксидаза и ионы тиоцината); факторы врожденного и адаптивного иммунитета.

Лактоферрин конкурирует с бактериями за железо, делая его недоступным для них.

Лактопероксидаза, в присутствии экзогенной перекиси водорода (полученной в результате жизнедеятельности некоторых патогенов, например стрептококков), может окислять ионы тиоцината до бактериостатического соединения OSCN<sup>-</sup>:



Липосахариды проникших бактерий вызывают продукцию липосахарид-связывающих белков (LBP) и экспрессию рецепторов CD14, которые способствуют нейтрализации и элиминации бактериальных клеток.

В ответ на развитие воспалительной реакции в молочную железу проникают различные фагоцитирующие клетки, которые также способствуют развитию противомикробной резистентности. Помимо функций АПК, они секретируют различные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-8, фактор некроза опухолей  $\alpha$ ) и противомикробные соединения (лактоферрин, перекись водорода, лизосомальные пероксидазы).

Взаимодействие лактоферрина коровьего молока с бактериями *Streptococcus agalactiae* активирует субъединицу C1q, тем самым запуская активацию системы комплемента по классическому пути.

В ходе развития воспаления в инфицированных тканях увеличивается циркуляция Th17-клеток.

В молоке также содержатся иммуноглобулины: IgA (преобладает в молоке животных с однокамерным желудком) и IgG1 (преобладает в молоке жвачных животных). IgG1 переносится в молоко (и молозиво) из сыворотки крови животных посредством активного транспорта с использованием рецепторов FcRn на эпителиальных клетках молочной железы.

Ранее считалось, что развитие местного иммунитета вымени посредством вакцинации является неэффективным. Однако последние исследования показывают, что возможно создать вакцинныепрепараты, которые позволяют успешно предотвращать (или значительно снижать негативные последствия) маститы, вызванные стрептококками, стафилококками, кишечной палочкой [11, 22, 38].

### **Слизистые оболочки дыхательных путей**

Основная функция органов дыхания — доставка кислорода воздуха в альвеолы лёгких, где и происходит

газообмен. Однако вместе с воздухом в органы дыхательной системы попадает большое количество посторонних частиц, включая патогенные микроорганизмы. Для защиты от неблагоприятного воздействия патогенной микрофлоры в арсенале организма животного имеются следующие механизмы.

Во время дыхания создается турбулентный поток воздуха, который обеспечивает прилипание посторонних частиц к слизи, покрывающей внутреннюю (слизистую) поверхность органов дыхания (особенно верхнего отдела). Слизь, вырабатываемая бокаловидными клетками, содержит различные антимикробные вещества и соединения: лизоцим, лактоферрин, белки сурфактанта, катионные пептиды (дефензины, кателицидины), поэтому большая часть микроорганизмов, попавших в слизь, быстро уничтожается.

Наиболее значимыми белками сурфактанта (поверхностно-активными белками) являются SP-A, -B, -C, -D. Они могут действовать как опсонины, активируют макрофаги, способствуют хемотаксису, усиливают кислородный взрыв и производство воспалительных цитокинов. Данные белки также способствуют удалению апоптотических клеток из легкого, что особенно важно для завершения процесса воспаления.

За счет действия ресничек слой слизи находится в постоянном движении в направлении из организма животного наружу, что обеспечивает удаление и уничтожение «пойманных» микроорганизмов. Ком слизи поступает к глотке, где проглатывается, и вся патогенная микрофлора подвергается перевариванию.

Патогены, которые смогли избежать контакта и уничтожения в слизи, попадают в альвеолы, где их поглощают альвеолярные макрофаги. Последние располагаются на поверхностях альвеол,

где имеют возможность прямого контакта с воздухом и патогенами, поступающими с ним. Важно, чтобы в процессе фагоцитоза возможные воспалительные реакции не мешали газообмену. По этой причине при отсутствии инфекции альвеолярные макрофаги находятся в состоянии покоя и имеют тенденцию подавлять местную продукцию цитокинов. Однако они обладают высокой фагоцитарной активностью и в случае проникновения патогена быстро включаются в иммунные реакции.

Дыхательные пути содержат бронхиальные лимфоидные узелки, а также лимфоциты, диффузно распределенные по легким и дыхательным путям.

На слизистой оболочке верхних дыхательных путей присутствует большое количество секреторного IgA, в бронхах и альвеолах преобладает содержание IgG (*рис. 33*).

Легкие большинства домашних животных (свиней, лошадей, овец, коз, крупного рогатого скота, кошек) отличаются от легких грызунов, людей или собак тем, что они содержат большое количество внутрисосудистых макрофагов. В результате легкие этих видов животных могут удалить больше патогенов из крови, чем печень и селезенка. До конца пока не выяснено, являются ли макрофаги легких эффективными антигенпрезентирующими клетками.

В эпителии дыхательных путей и альвеол также находится большое количество дендритных клеток, выполняющих роль АПК.

Долгое время считалось, что в норме дыхательные пути стерильны, т.е. в них отсутствует сапрофитная микрофлора и соответственно она не играет какой-либо роли в развитии защитных механизмов дыхательных путей. Однако это не совсем так. Животные вдыхают

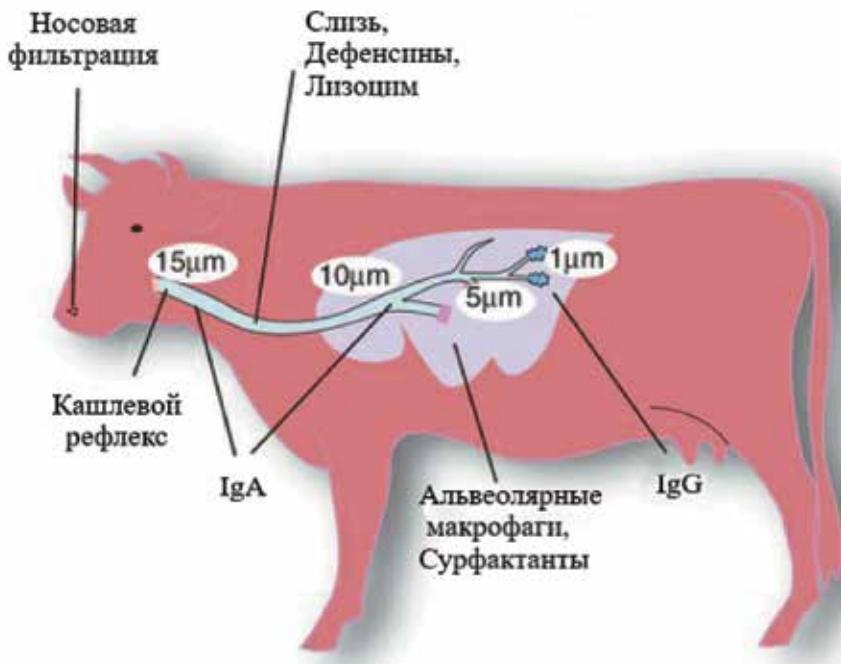


Рис. 33. Механизмы защиты органов дыхания  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

микрофлору с первым своим вдохом, поступающие микроорганизмы не вызывают развитие серьезных воспалительных реакций и патологий, но они запускают каскад реакций врожденного иммунитета, которые приводят к образованию поверхностно-активных веществ, дефензинов, интерферонов, лактоферрина, оксидантов и пр., что является важным звеном защиты при встрече с патогенными микроорганизмами [11, 22, 38].

### Урогенитальный тракт

В мочевыводящей системе важную роль при защите от инфекционных патогенов играют такие физические факторы, как эффект промывания и низкий уровень pH мочи.

Репродуктивный тракт коровы можно разделить на нижнюю (влагалище и шейка матки) и верхнюю (матка и маточные трубы) части. Нижняя часть выстлана многослойным плоским эпителием, верхняя — столбчатым эпителием. Весь репродуктивный тракт покрыт слизью с выраженным антимикробным действием. В нижней части кератиноциты экспрессируют паттернраспознающие рецепторы, продуцируют цитокины и антимикробные пептиды. В верхней части находится большое количество макрофагов, дендритных клеток и врожденных лимфоидных клеток. Преобладающим иммуноглобулином в цервико-вагинальной слизи является IgA, непосредственно в матке — IgG.

Важную роль в защите влагалища от инфекции играет поверхностно-активный белок A.

Эпителиальные клетки женских половых путей экспрессируют интерферон- $\epsilon$  (относится к интерферонам I типа). Его экспрессия не связана с участием паттернраспознающих рецепторов и регулируется гормонально.

Мыши с дефицитом ИФН- $\epsilon$  проявляют повышенную восприимчивость к инфекциям, передаваемым половым путем, таким как вирус простого герпеса 2 типа и *Chlamydia muridarum*, что позволяет предположить важную роль данного интерферона в защите женских репродуктивных путей. ИФН- $\epsilon$  был обнаружен у людей, крупного рогатого скота, свиней и собак.

Половая система быка также защищена от воздействия инфекционных патогенов. Эпителиальные клетки, выстилающие уретру, экспрессируют паттернраспознающие рецепторы, в тканях массово встречаются макрофаги и дендритные клетки. В семенной плазме преобладает IgG, также присутствует IgA, которые секретируются В-клетками, в основном находящимися в уретре полового члена и предстательной железе. Т-лимфоциты в изобилии присутствуют в уретре, семенниках и крайней плоти. Антимикробные пептиды обнаружены в семенниках, семенных пузырьках и простате [11, 22, 36, 38].

### Желудочно-кишечный тракт

Слой энтероцитов, выстилающий желудочно-кишечный тракт, является самой большой поверхностью между телом и внешней средой, соответственно это потенциально наибольшая поверхность для внедрения микроорганизмов (не только патогенных, но и представителей нормальной микрофлоры).

Слюна богата IgA, содержит большое количество разнообразных антимикробных веществ, которые в совокупности эффективно справляются с патогенами. Миндалины также секрецируют много IgA, но из-за тонкого эпителия над ними очень уязвимы для микробной инвазии.

У животных с однокамерным желудком желудочный сок, как правило, имеет весьма низкий уровень рН, что придает ему сильные антимикробные свойства.

В тонком отделе кишечника микрофлора и энтероциты разделены слоем слизи, содержащей множество антимикробных белков. Слизь действует как смазка, блокирует химические воздействия и может улавливать, а затем способствовать изгнанию патогенов. В толстом кишечнике это разделение осуществляется за счет двух отдельных слоев слизи: внутренний слой — богат дефензинами и лизоцимом, почти не содержит микроорганизмов, и внешний рыхлый слой — содержит большое количество бактерий. У новорожденного животного для развития этих слоев слизи требуется время, и это дает возможность таким патогенным микроорганизмам добраться до энтероцитов и вызывать их поражение.

Кишечный эпителий состоит из энтероцитов, бокаловидных клеток и клеток Панета, которые в совокупности образуют эффективный физический барьер, имея плотные контакты между клетками и покрытие из прикрепленных гликопротеинов муцина, образующих гликокаликс (*рис. 34*). В дополнение к бокаловидным клеткам, которые продуцируют слизь, энтероциты могут

продуцировать разнообразные антимикробные пептиды. В тонком кишечнике это преимущественно  $\alpha$ -дефензины и RegIII  $\alpha$  и  $\beta$ , в то время как в толстом кишечнике это  $\beta$ -дефензины и кателицидины.

Клетки Панета — специализированные кишечные эпителиальные клетки, активно экспрессирующие TLR. При распознавании патогенассоциированных молекулярных паттерн микрофлоры они секретируют большое количество  $\alpha$ -дефензинов. Большинство этих дефензинов представляют собой амфипатические молекулы, действующие как детергенты: внедряясь в стенки микробных клеток, они препятствуют синтезу липидов бактерий и вызывают их лизис.

Один из дефензинов (дефензин  $\alpha$ -6) действует иначе. Он не обладает прямым антибактериальным действием, но при высвобождении из гранул клеток Панета самопроизвольно собирается в удлиненные молекулярные сети, которые окружают, запутывают и удерживают бактерии.

Кишечные дефензины накапливаются в криптах кишечника, достигая очень высоких концентраций в слое слизи, ближайшем к эпителию. Они выполняют барьерную функцию, предотвращая проникновение микрофлоры (в том числе и нормальной) в про-

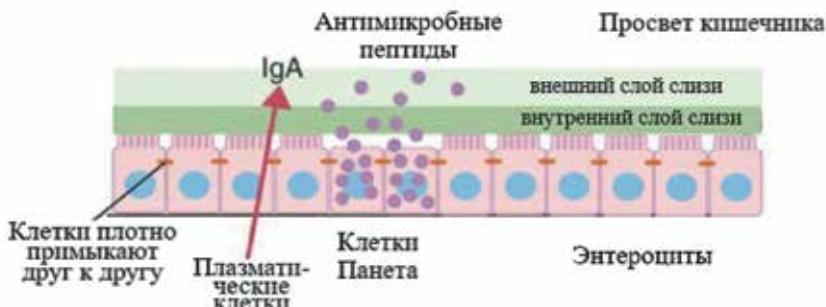


Рис. 34. Механизмы защиты слизистой оболочки кишечника  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

странство крипты, тем самым снижая микробный контакт с энтероцитами. Смесь дефензинов избирательно убивает некоторые виды бактерий и, как следствие, также регулирует состав микрофлоры кишечника.

У крупного рогатого скота экспрессия генов дефензина происходит в тонком и толстом отделах кишечника. Дефензины крупного рогатого скота секрециируются в виде активных молекул, в отличие от молекул человека и мыши, которые секрециируются в виде неактивных предшественников и впоследствии активируются трипсином в кишечнике. Инфекционные, паразитарные или другие инвазии могут увеличивать выработку  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензинов.

Энтероциты обладают полным набором паттернрраспознающих рецепторов и могут воспринимать сигналы, исходящие от микрофлоры, затем передавая эти сигналы иммунным клеткам *lamina propria* (собственной пластинки кишечника) и активно участвуя в формировании местного иммунного ответа. Энтероциты секретируют регуляторные цитокины или отвечают на них, помогают поддерживать баланс между противовоспалительными и провоспалительными сигналами [11, 22, 36, 38].

## 6. Развитие иммунной системы у плода

Период стельности коровы составляет 280 дней. В процессе внутриутробного развития плода происходит закладка тканей и органов иммунной системы. Тимус у плода обнаруживают через 40 суток после оплодотворения. Костный мозг и селезенка появляются на 55-е сутки (рис. 35). Лимфатические узлы обнаруживают через 60 суток, но

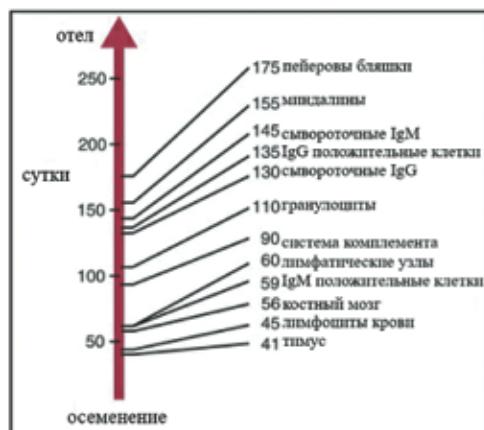


Рис. 35. Стадии развития иммунной системы теленка во внутриутробный период  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

пейеровы бляшки не появляются до 175 суток. Лимфоциты выявляются у плодов к 45 суткам, IgM+ В-клетки — к 59 суткам и IgG+ В-клетки — к 135 суткам.

Плод может реагировать специфическим гуморальным иммунным ответом на ротавирус КРС через 73 суток после оплодотворения, на парвовирус и вирус парагриппа-3 — через 93 и 120 суток соответственно. Лимфоциты крови плода могут реагировать на митогены между 75 и 80 сутками, но эта способность временно теряется ближе к моменту отела в результате высокого производства стероидов.

Различные субпопуляции Т-клеток у телят имеются на уровнях, сопоставимых со взрослыми животными. Количество В-клеток значительно увеличивается в течение первых 6 месяцев после рождения.

Компоненты врожденного иммунитета, а также первой стадии адаптивного гуморального иммунного ответа (IgM) приобретают свою функциональную активность в течение первой недели жизни [38].

## **7. Формирование пассивного иммунитета у новорожденных телят**

В отличие от человека, у которого гемохориальный тип строения плаценты способствует молекулярному транспорту иммуноглобулинов из материнской крови к плоду, жвачные имеют эпителиохориальный тип строения плаценты, препятствующий этому транспорту. Т.е. структура плаценты крупного рогатого скота непроницаема для иммуноглобулинов, поэтому передача материнского иммунитета новорожденным осуществляется через молозиво матери.

Таким образом, телята в пренатальный период не получают иммуноглобулины из крови матери и рождаются агаммаглобулинемичными. Однако большое количество материнских IgG селективно транспортируется в молочную железу непосредственно перед отелом. IgG с молозивом поглощаются и абсорбируются в кишечнике новорожденного теленка и в неизменном виде попадают в кровь.

Транспорт материнских иммуноглобулинов в молозиво у жвачных является высокоселективным процессом. IgG1 транспортируется из материнской крови в молозиво с помощью IgG1 FcRn-опосредованного транспорта через эпителий молочной железы, обеспечивающего преимущественное количество IgG1-подкласса в молозиве жвачных. Кишечник новорожденных телят в высокой степени адаптирован для проникновения иммуноглобулинов через эпителий в кровь. Установлено, что все изотипы иммуноглобулинов молозива абсорбируются в кишечнике новорожденных телят с одинаковой эффективностью, поэтому доминирование IgG1 в молозиве гарантирует его преобладание

и в сыворотке крови подсосных телят. Абсорбция иммуноглобулинов осуществляется только на протяжении первых 24–48 часов жизни, когда большая часть слабо окрашивающихся клеток с вакуолями кишечного эпителия новорожденных жвачных еще не заменилась клетками, характерными для кишечника зрелых животных, обеспечивающими прекращение процесса абсорбции. Эта адаптация обеспечения пассивной передачи материнских антител к плоду отражает различия в составе молозива между видами, имеющими пре- и постнатальный транспорт антител. У человека с трансплацентарным переносом IgG отмечается очень низкий уровень IgG в молозиве и относительно высокий уровень IgA, тогда как жвачные животные, наоборот, имеют высокий уровень IgG и относительно низкий уровень IgA в молозиве, хотя увеличение соотношения IgA/IgG происходит в конце лактации и в инволюционных секретах. В табл. 3 представлены данные различных исследователей по концентрации иммуноглобулинов в молозиве и молоке разных видов животных и человека.

Примечательно то, что большая часть IgA в молоке локально синтезируется плазматическими клетками, расположенными под эпителием молочных желез. Несомненно, существует обратная зависимость в соотношении между сывороточным IgA в молоке жвачных и количеством IgA-продуцирующих плазматических клеток, представленных в железе. Когда постепенно происходит уменьшение количества сывороточного IgA в молоке от начала к концу лактации и инволюции молочной железы, тогда значительно увеличивается число IgA-продуцирующих плазматических клеток в молочной железе. Хотя причины увеличения количества IgA-продуцирующих плазматических кле-

ток неизвестны, этот феномен дает возможность антителам, генерированным на антигенную стимуляцию на отдаленных слизистых, проникать в молоко, особенно в период начала лактации, когда локальная продукция IgA низка.

Параллельно с увеличением локальной продукции IgA в процессе лактации происходит снижение селективного транспорта сывороточного IgG1 в молоко.

В то время как антитела в молозиве являются преобладающими иммунными эффекторами, транспортируемыми к новорожденному, клетки и другие (растворимые) факторы иммунитета в молоке также играют значительную роль в основе пассивной защиты.

В молоке в норме находится большое количество жизнеспособных иммунокомпетентных клеток, от  $5 \times 10^4$  до  $2 \times 10^6$  клеток/мл, хотя значительно большие количества могут встречаться при развитии в молочной железе воспалительных процессов.

Растворимые факторы, не относящиеся к иммуноглобулинам, также являются важными эффекторами пассивной иммунной защиты. В молоке у человека и животных присутствуют

антибактериальные субстанции, такие как молочная кислота, интерферон, лизоцим, лактоферрин и компоненты комплемента C3 и C4. В молоке коров обнаружен фактор некроза опухолей β, который проявляет сильный модулирующий эффект на состояние здоровья и развитие новорожденного.

Отечественными учеными были проведены исследования по оценке содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови телят с момента рождения до 2-месячного возраста. Максимальный уровень иммуноглобулинов всех типов (IgG —  $21,5 \pm 3,4$ ; IgM —  $2,65 \pm 0,22$ ; IgA —  $0,8 \pm 0,2$  мг/мл) установлен в суточном возрасте (что связано с приемом молозива). При этом основным типом в сыворотке крови телят является IgG, составляющий 80,6–85,7%, а в носовом секрете и слезной жидкости — IgA, 42,5–67% и 47,4–80,7% соответственно.

С возрастом происходит постепенное снижение уровня иммуноглобулинов, и минимальные значения их установлены в 10–40-суточном возрасте. В последующем отмечено постепенное повышение иммуноглобулинов всех типов, что связано с началом их собственного синтеза в организме новорожденных [1, 38].

**Таблица 3. Концентрация иммуноглобулинов (мг/мл) в молозиве и молоке различных видов млекопитающих**

Вид	Секреты	IgG		IgA	IgM
		IgG1	IgG2		
Корова	молозиво	75,0	1,9	4,4	4,9
	молоко	0,4	0,06	0,05	0,04
Коза	молозиво	58,0		1,7	3,8
	молоко	0,3		0,06	0,03
Лошадь	молозиво	60,0		н/и*	н/и
	молоко	0,4		0,8	0,07
Собака	молозиво	14,5		3,1	2,2
Кролик	молозиво	2,4		4,5	0,1
Свинья	молозиво	58,7		10,7	3,2
Человек	молозиво	0,2		17,9	0,8

\* н/и — не исследовано.

## II. ВАКЦИНАЦИЯ

В основе вакцинации лежит иммунологический феномен, называемый иммунологической памятью [16].

Иммунологическая память — способность иммунной системы к более быстрому и эффективному ответу на антиген, с которым организм встречался ранее (вторичный ответ). Она обусловлена наличием иммунных клеток памяти — длительно живущих субпопуляций антиген-специфических Т- и В-клеток, которые значительно быстрее и активнее реагируют на повторное введение антигена. Клетки памяти находятся на стадии  $G_1$  клеточного цикла (т.е. вышли из стадии покоя  $G_0$ ) и готовы к быстрому превращению в эффекторные клетки при очередном контакте с антигеном [5, 18, 32].

В процессе превращения наивных Т-клеток в клетки памяти наиболее значимые изменения происходят в маркере CD45, обеспечивающем передачу сигнала внутрь клетки при контакте со специфическим антигеном. Для активации клеток памяти требуется меньшая концентрация антигена, они обладают более выраженной хемотаксической активностью, вырабатывают преимущественно эффекторные цитокины.

Иммунологическая память (особенно у Т-клеток), очень стойкая, благодаря

чему удается искусственно формировать длительный противоинфекционный иммунитет. Преобладающее направление развития вторичного иммунного ответа обусловлено субпопуляционной принадлежностью Т-клеток памяти и, соответственно, последующей их дифференциацией в Th1-, Th2-, Th17- или Tfh-клетки [12, 18, 37, 38].

Для развития вторичного иммунного ответа характерны следующие особенности:

- 1) меньшая доза антигена, провоцирующая развитие специфического иммунного ответа;
- 2) сокращение времени, необходимого для полноценного развития специфического клеточного и гуморального иммунного ответа (рис. 36);
- 3) увеличение напряженности и длительности иммунного ответа;
- 4) сокращение периода образования IgM и более быстрый переход на синтез IgG и IgA;
- 5) увеличение специфичности гуморального иммунитета за счет повышения аффинности антител;
- 6) увеличение экспрессии молекул ГКГС II класса на поверхности В-клеток.

На рис. А представлена динамика образования антител при первичном и вторичном введении антигена, фазы: а —

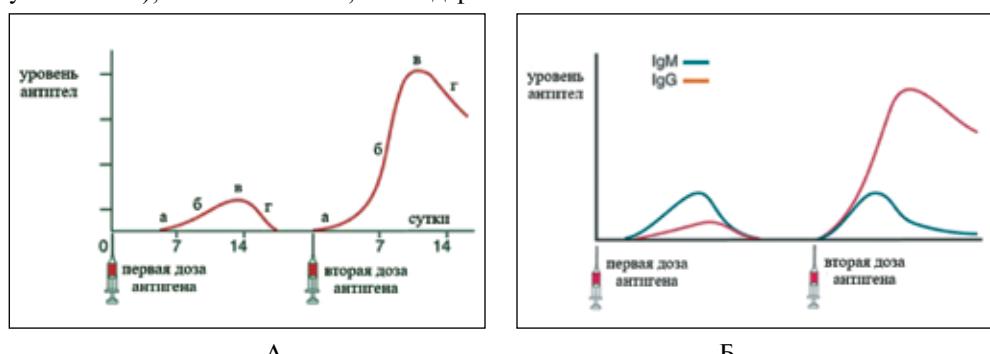


Рис. 36. Динамика образования антител (включая IgM и IgG) при первичном и вторичном введении антигена (Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

латентная; б — логарифмического роста; в — плато; г — фаза снижения.

На рис. Б представлена динамика образования иммуноглобулинов классов M (IgM) и G (IgG) при первичном и вторичном введении антигена.

Латентная или лаг-фаза (а): в этот период АПК распознают, захватывают и презентируют антиген в составе комплекса с молекулами ГКГС II класса Tfh-клеткам, которые индуцируют В-клетки к пролиферации и дифференцировке в антителосекретирующие плазмоциты.

В фазу роста или лог-фазу (б) происходит экспоненциальное увеличение количества антител в сыворотке крови.

В фазу плато (в) уровень антител стабилизируется.

В фазу снижения (г) — после достижения максимального титра антител — происходит его снижение, причем сначала относительно быстро, а затем медленно. Длительность фазы снижения зависит от соотношения скорости синтеза анти-

тел и их полураспада. Когда снижение уровня протективных антител достигает критического, защита падает и становится возможным заболевание при контакте с источником инфекции. Поэтому для поддержания напряженного иммунитета часто необходимо вводить бустерные дозы вакцины [5, 10, 16].

При первичном иммунном ответе в основном продуцируются IgM, при вторичном плазматические клетки переключаются на синтез более зрелых изотипов и продуцируют антитела IgG, IgA или IgE (рис. 37). Вторичный ответ характеризуется более короткой латентной фазой и более продолжительными фазами плато и снижения. Уровень антител при вторичном ответе в 5–10 раз выше, чем при первичном. Кроме того, значительно повышается аффинность антител, при этом степень возрастания аффинности обратно пропорциональна дозе антигена [12, 18, 37, 38].

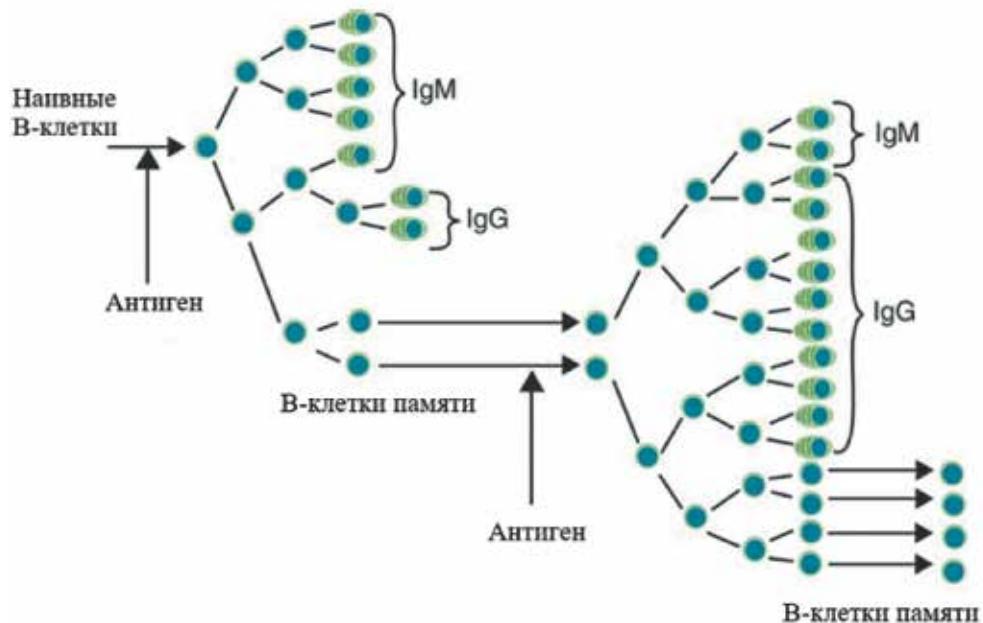


Рис. 37. Первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

Факторы, которые могут негативно повлиять на развитие вторичного иммунного ответа:

- слабый антиген;
- наличие эффекторных антител;
- неспособность макроорганизма отвечать на антигенный раздражитель (различные иммунодефициты);
- ранний возраст [5, 18].

Формирование иммунного ответа на введение вакцины, по сути, имитирует естественный инфекционный процесс и представлено следующими этапами (рис. 38):

- захват АПК антигенов вакцины, расщепление и представление на клеточной поверхности эпитопов антигенов в комплексе с молекулами ГКГС I и/или II класса;
- распознавание антигенов специфическими Т- и В-клетками;
- активация, пролиферация и дифференцировка Т-клеток: появление регуляторных (Т-хелперов), эффекторных (цитотоксических) и Т-клеток памяти;

— активация, дифференцировка В-клеток и образование антителсекретирующих плазматических клеток и В-лимфоцитов памяти, синтез специфических антител;

— апоптоз эффекторных Т- и В-клеток [12, 18, 19, 22, 37, 38].

На рисунке приведена поэтапная схема развития адаптивного иммунного ответа с момента проникновения антигена (в нашем случае — после вакцинации) до апоптоза эффекторных клеток и образования клеток памяти.

### III. ТИПЫ ВАКЦИН. СТРАТЕГИЯ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Исторически свое название вакцина получила от латинского слова *vaccina* — ‘корова’, точнее *vaccinia* — ‘коровья оспа’. Английский врач Эдвард Дженнер впервые применил на 8-летнем мальчике вакцину против натуральной оспы, полу-

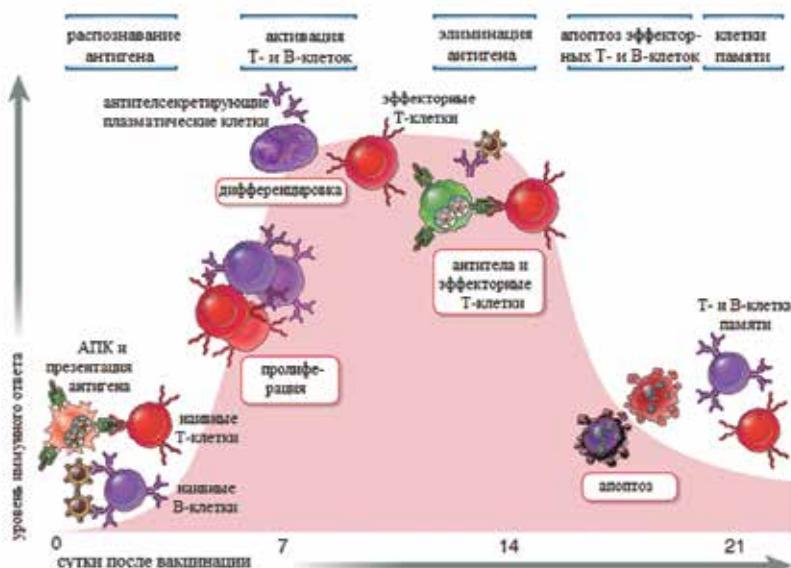


Рис. 38. Развитие адаптивного иммунного ответа  
(Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017)

ченную из содержимого пустулы с руки женщины — молочницы, заразившейся от коровы коровьей оспой. Лишь спустя почти 100 лет Луи Пастер сформулировал идею специфичности действия различных возбудителей, которые являются причиной возникновения отдельных инфекций, а из этого последовал принцип применения ослабленных микроорганизмов для формирования иммунитета против вирулентных штаммов. Первые вакцины в большинстве своем были живые (Э. Дженнер — вирус коровьей оспы для профилактики натуральной оспы человека, 1796; Л. Пастер — вакцина против бешенства, 1885; Л.С. Ценковский — вакцина против сибирской язвы животных, 1886). Мощным толчком для развития инактивированных вакцин послужило открытие эффекта адьюванта (Г. Рамон, 1925 г., А. Гленни, 1926 г.) [10, 19].

Вакцинопрофилактика по праву считается одним из наиболее значимых достижений биологии. Вакцинация

является самой массовой формой как ветеринарного, так и медицинского вмешательства и касается практически каждого домашнего животного или человека соответственно.

Все существующие и вновь разрабатываемые вакцины можно разделить на следующие группы (рис. 39):

- классические живые аттенуированные вакцины;
- гетерологичные бактерии или вирусы;
- инактивированные вакцины;
- анатоксины;
- генно-инженерные вакцины, которые можно разделить на несколько подгрупп:
  - рекомбинантные субъединичные вакцины на основе белков-антигенов, экспрессированных *in vitro* в клетках эукариотов или прокариотов;
  - рекомбинантные живые вакцины;
  - вакцины, полученные путем деления генов возбудителя;
  - синтетические пептидные вакцины;

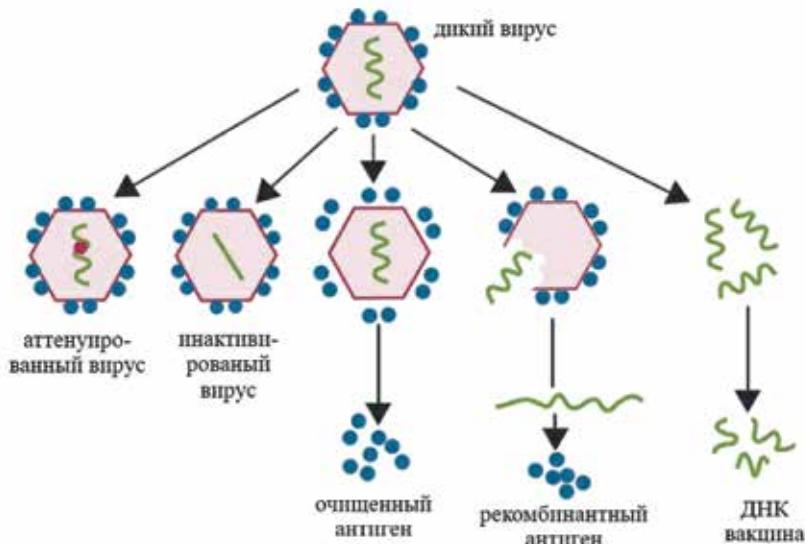


Рис. 39. Схема получения разных типов вакциныных препаратов  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

- коньюгированные вакцины;
- ДНК-вакцины.

В животноводстве в настоящее время имеют широкое применение четыре типа вакцин: живые, инактивированные, анатоксины и рекомбинантные вакцины [16, 19, 38].

### Живые вакцины

Это, как правило, искусственно ослабленные или природные слабовирулентные, но иммуногенные штаммы микроорганизмов, которые, размножаясь в естественно-восприимчивом организме, не проявляют повышения вирулентности и потеряли способность к горизонтальной передаче.

Для аттенуации микроорганизмов обычно применяют пассажи в неестественном хозяине (или культуре клеток — для вирусов), пассажи при повышенной или пониженной температуре, мутагенез с последующей селекцией мутантов с измененным фенотипом.

Все популяции микроорганизмов характеризуются генетическим полиморфизмом, в основе которого лежат спонтанные мутации как результат ошибок при считывании генома в процессе размножения. Спонтанные мутации ответственны за фенотипические изменения различных свойств микроорганизмов, в т.ч. вирулентности. В естественных условиях микроорганизмы в процессе передачи от хозяина к хозяину совершают множество циклов репродукции, и за этот период постоянно генерируются спонтанные мутации, которые могут вызвать изменения свойств микроорганизмов. В организме естественно-восприимчивого хозяина селекционируются преимущественно вирулентные штаммы. Адаптация микроорганизмов к неестественным условиям размножения сопровождается прогрессирующей селекцией мутантов,

при этом преимущественно накапливаются мутанты, которые размножаются быстрее, чем полевые штаммы. Затем такие мутанты селекционируют и определяют пригодность для использования в производстве живых вакцин. В качестве вакцинных штаммов пригодны те аттенуированные мутанты, которые способны недолго размножаться в организме естественного хозяина, но при этом теряют свою вирулентность для него и в то же время способны вызывать выраженный иммунный ответ.

Генетические мутации наиболее часто сопровождаются заменой единичных нуклеотидов (точечные и миссенс-мутации). Реже мутации связаны с делецией (потерей) или инсерцией (вставкой) единичных нуклеотидов или блоков нуклеотидов.

Аттенуация микроорганизмов путем многократного пассирования в системе неестественного хозяина (или неестественных условиях) дала множество ценных практических результатов. И все же данный процесс остается эмпирическим, в целом неуправляемым, а результаты — непредсказуемыми, поэтому в настоящий период времени активно развивается генно-инженерное конструирование вакцин, когда ученые направленно изменяют генетическую структуру микроорганизмов с целью получения штаммов с заданными свойствами.

В основе эффективности живых вакцин лежит имитация субклинической инфекции, их преимущество заключается в активизации всех звеньев иммунной системы, вызывающей сбалансированный иммунный ответ.

Наряду с генетически закрепленной утратой патогенных свойств вакцинны штаммы сохраняют способность размножаться в месте введения, а потом и в регионарных лимфоузлах, вызывая вакцинную инфекцию. Она может продолжаться до нескольких недель, не

сопровождаясь клинической картиной заболевания, но формируя стойкий иммунитет к вирулентным штаммам этого возбудителя, при этом количество образующегося антитела значительно превышает то его количество, которое поступает с инактивированной вакциной.

Основными преимуществами живых вакцин является то, что они создают стойкий и длительный иммунитет и, как правило, требуют однократной вакцинации.

Но имеется ряд факторов, ограничивающих их разработку и внедрение:

- невозможность для многих возбудителей селекционировать безопасные, но иммуногенные штаммы;
- угроза реверсии вирулентных свойств у аттенуированных микроорганизмов;
- ограниченное использование живых вакцин для стельных животных;
- ограничения на применение живых вакцин при возникновении вспышки заболевания.

Современным требованием к живым вакцинам является наличие маркера — как правило, это ген, кодирующий определенный иммуногенный белок, которого нет в геноме полевых штаммов возбудителя или, наоборот, в геноме маркированного штамма отсутствует легко выявляемый ген, присущий полевым изолятам. Такой маркер необходим для того, чтобы распознать постvakцинальный иммунный ответ от естественного инфекционного процесса, а также для контроля возможности распространения возбудителя среди невакцинированного поголовья.

Характерным примером такого вакцинного препарата является живая маркированная вакцина против инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС. У маркированного штамма вируса ИРТ отсутствует ген, кодирующий глико-

протеин Е, который присутствует у полевых штаммов. Таким образом, если у вакцинированных животных выявляются вируснейтрализующие антитела в РН или антитела к другим гликопротеинам в ИФА, но отсутствуют антитела к гликопротеину Е, иммунный ответ к вирусу ИРТ вызван именно применением вакцины, а не циркуляцией полевых штаммов. Кроме того, можно контролировать, не передается ли вакциненный штамм другим животным.

На использовании маркированных вакцин построена стратегия DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) по искоренению инфекционного ринотрахеита КРС. Вакциненный вирус имеет легко выявляемые серологическими методами отличия от полевого вируса (отсутствие в геноме гликопротеина Е). В последующем вакцинированные животные легко дифференцируются, поскольку они имеют специфический антигенный маркер — у них отсутствуют антитела к гликопротеину Е при наличии антител к другим гликопротеинам вируса ИРТ или вируснейтрализующих антител. Если выявляются животные, серопозитивные к гликопротеину Е вируса ИРТ, то они подлежат своевременной выбраковке.

В настоящее время для животноводства имеется целый ряд живых аттенуированных вакцин против таких заболеваний, как:

- вирусная диарея (вызываемая вирусами I и II типов),
- инфекционный ринотрахеит,
- парагрипп-3,
- респираторно-синцитиальная инфекция и др.

Другим подтипов живых вакцин являются так называемые **гетерологичные живые вакцины** — вакцины, изготовленные на основе микроорганизмов, гетерологичных вирулентным микроорганизмам, но содержащих перекрестно-реагирующую

щие антигены, обеспечивающие инициирование развития иммунного ответа, достаточного для защиты уровня.

Эффективность применения таких вакцин основывается на выраженной антигенной общности близкородственных вирусов. А безопасность обусловлена редуцированной вирулентностью для неестественного хозяина и отсутствием горизонтальной передачи. Например, вирус панлейкопении кошек используют для профилактики парвовирусного энтерита собак. Или первая вакцинация, проведенная Дженнером вирусом коровьей оспы, против натуральной оспы человека [10, 16, 19, 38].

Следующим этапом развития вакцин стало получение **инактивированных препаратов**.

Инактивированные вакцины нашли широкое применение в животноводстве, поскольку для многих возбудителей инфекционных заболеваний пока не удалось селекционировать аттенуированные штаммы, пригодные для производства живых вакцин. В некоторых случаях использование живых вакцин является причиной заболевания или гибели животных.

Так, нередки случаи, когда использование вакцин, содержащих живой вирус вирусной диареи КРС, сопровождалосьabortами у стельных коров. Живая вакцина против бруцеллеза КРС из штамма *Brucella abortus* 19 вызывает продолжительный (вплоть до пожизненного) иммунитет к бруцеллезу, однако она отличается высокой реактогенностью и может вызывать такие негативные последствия, как abortы у стельных коров и орхиты у быков.

Как правило, инактивированные вакцины готовят из вирулентных штаммов микроорганизмов, инактивированных тем или иным способом. Важными условиями эффективности инактивированных вакцин являются количество

и качество антигена, выбор инактивирующего агента и оптимальных условий инактивирования, позволяющих полностью лишить микроорганизмы инфекционности при максимальном сохранении антигенностии.

Инактивирование вакцинных штаммов должно полностью исключить возможность распространения инфекционного заболевания при применении вакцины. Однако оно должно быть не только эффективным, но и максимально щадящим (селективным), т.е. сопутствующие изменения в структуре микроорганизмов и их компонентов должны быть минимальными. Для инактивирования микроорганизмов возможно применение химических или физических методов.

Из химических соединений наиболее часто используют два типа инактивирующих агентов: ретикулирующие (альдегиды, в т.ч. формальдегид) и алкилирующие агенты (бетапропиолактон, этиленимин и другие азиридины). Механизм действия складывается из ретикуляции белков и взаимодействия с аминокислотами, вследствие чего становится невозможна их репликация.

Необходимая концентрация инактивирующих агентов зависит от концентрации белков и нуклеиновых кислот в инактивируемой среде, температуры и гомогенности инактивируемого субстрата.

Формальдегид, взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами и белками, в основном реагирует с аминогруппами. Присоединение формальдегида к аминогруппам пуринов и пиrimидинов уничтожает матричную и инфекционную активность нуклеиновых кислот. Взаимодействие формальдегида с аминогруппами аминокислот и белков ведет к образованию метиольных производных, а в последующем — бисметиленовых производных. Продук-

ты взаимодействия формальдегида с аминокислотами способны вступать в реакцию с нуклеиновыми кислотами значительно быстрее, чем сам формальдегид.

Помимо формальдегида, для инактивации микроорганизмов широко используют бетапропиолактон и этиленимин. Одним из преимуществ этих инактиваторов является то, что они полностью гидролизуются с образованием нетоксичных продуктов.

Наиболее распространенными физическими методами инактивации вирусов являются гамма и ультрафиолетовые лучи. Однако ввиду ряда сложностей, возникающих при использовании данных методов инактивации, они редко используются на практике.

Принципиальным отличием инактивированных вакцин от живых является то, что они в своем составе содержат инактивированные (убитые) возбудители. Из этого складываются их основные преимущества и недостатки. К преимуществам, безусловно, относится эпизоотическая безопасность инактивированных вакцин, т.е. полностью исключена возможность распространения возбудителя с препаратом.

С другой стороны, возбудитель инактивирован и не может размножаться в организме вакцинированного животного, стимулируя иммунную систему естественным путем, поэтому инактивированные возбудители в «чистом» виде не обладают достаточной иммуностимулирующей активностью. Для повышения активности таких препаратов в их состав включают адьювант. Более подробно адьюванты будут описаны ниже.

Указанные особенности классических инактивированных вакцин в полной мере распространяются и на другие типы вакциновых препаратов, которые в своем составе не содержат живых ми-

кроорганизмов (анатоксины, рекомбинантные субъединичные вакцины, синтетические пептидные вакцины и др.) [12, 18, 19, 20, 37, 38].

### **Анатоксины**

Патогенное воздействие многих бактерий обусловлено выделяемыми экзотоксинами, продуктами жизнедеятельности, а также эндотоксинами, которые высвобождаются в процессе разрушения бактериальных клеток. В некоторых случаях возможно создание иммунитета непосредственно к токсинам микроорганизмов при помощи вакцинальных препаратов — анатоксинов. Анатоксины готовят из токсинов различных возбудителей, которые подвергают инактивации, без потери иммуногенности. Очищают от балластных веществ и смешивают с адьювантом.

Анатоксины обеспечивают формирование антитоксического иммунитета, который не предотвращает бактерионосительство.

Типичными представителями анатоксинов являются вакциновые препараты против клоstrидиозов, вызываемых *Clostridium novyi* (*oedematiens*), *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* и др., которые в своем составе содержат не цельноклеточные бактериальные антигены, а продуцируемые ими токсины в инактивированной форме [10].

### **Рекомбинантные субъединичные вакцины**

В настоящее время все большее распространение получают рекомбинантные субъединичные вакцины, изготовленные на основе отдельных протективных антигенов (белков), полученных в экспрессирующей клеточной системе.

У возбудителя определяют протективный антиген, который при введе-

ний в организм животного способен вызвать иммунный ответ, приводящий к нейтрализации цельного возбудителя. В последующем определяют ген, который кодирует этот протективный антиген, вырезают его или синтезируют искусственно, а затем вшивают в геном носителя (бактерии, дрожжевые клетки или бакуловирус). В дальнейшем в процессе размножения такого химерного микроорганизма-продуцента происходит экспрессия (наработка) целевого протективного антигена. При этом геном продуцента настроен таким образом, что экспрессия целевого антигена во много раз превышает синтез других белков (рис. 40).

Способ получения рекомбинантных субъединичных противовирусных вакцин используют, когда вирус не раз-

множается в культуре клеток (вирус гепатита В) или размножается с невысоким накоплением, недостаточным для изготовления инактивированных вакцин, или в случае, когда изготовление цельновирионной вакцины представляет биологическую опасность (некоторые лентивирусы, филовирусы, хантавирусы, аренавирусы человека).

К этой же группе можно отнести вакцины, полученные на основе *Virus-like particle* (VLP) — вирус-подобных частиц. VLP представляют собой наночастицы, состоящие из неинфекционного подмножества вирусных компонентов (полученных в какой-либо системе экспрессии), которые имитируют структуру вируса дикого типа, но не обладают вирусным генетическим материалом, тем самым представляя

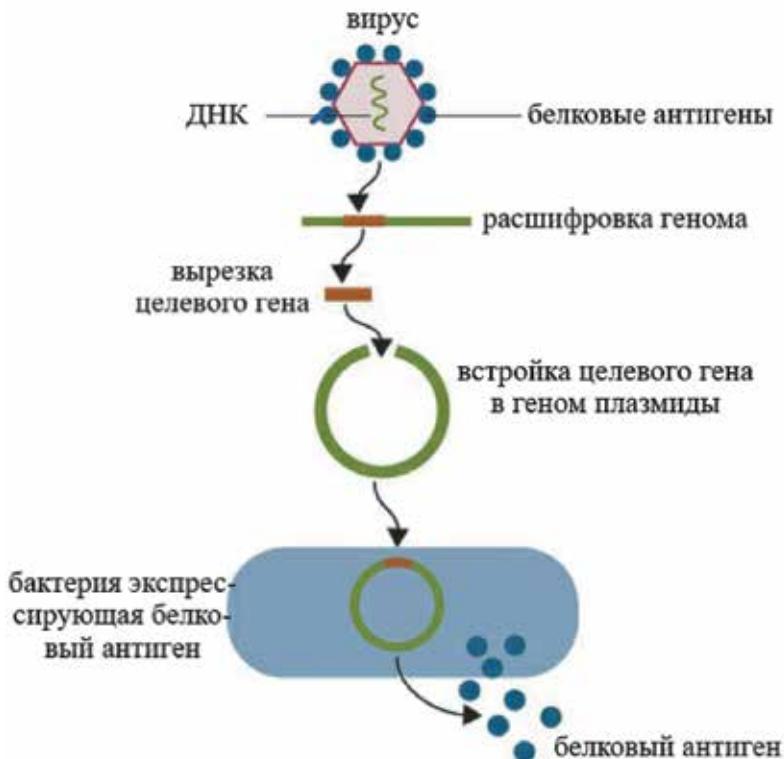


Рис. 40. Схема получения рекомбинантных белков  
(Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

целую, но неактивную вирусную частицу [16, 18, 19, 38].

### Рекомбинантные живые векторные вакцины

Важным достижением технологии рекомбинантной ДНК явилось открытие возможности замены удаленного гена чужеродным геном. Этот метод позволяет использовать одни микроорганизмы как векторы для переноса генов, кодирующие протективные антигены других микроорганизмов.

Например, в геном авибулентного вируса вставляют ген интересующего вируса, кодирующий антиген, вызывающий протективный ответ в привитом организме. Модифицированный таким

образом авибулентный вирус используют как живую вирусную вакцину. Клетки, в которых векторный вирус реплицируется *in vivo*, экспрессируют чужеродный белок, вызывающий гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ на данный белок.

Наиболее часто используемыми в качестве векторов при создании живых рекомбинантных вакцин являются вирусы оспы, адено-, бакуло- и герпесвирусы.

Характерным представителем рекомбинантной живой векторной вакцины является препарат «Спутник V» — вакцина против коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19), состоящий из аденоизирусного вектора, в который встроен ген, кодирующий протективный S белок коронавируса [12, 18, 38].

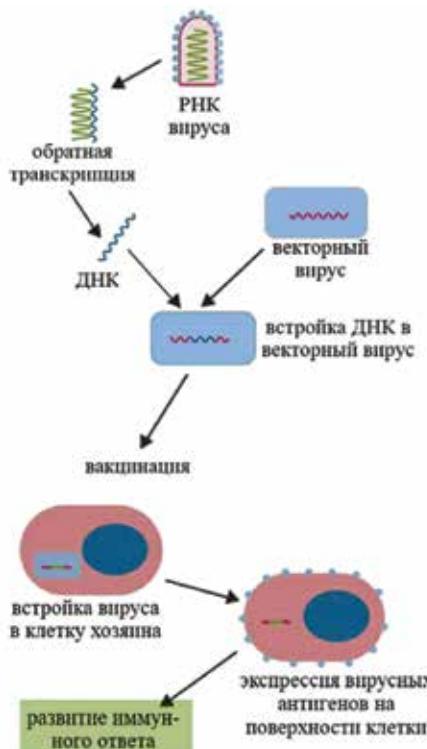


Рис. 41. Схема получения и функционирования рекомбинантной векторной вакцины (Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

### Расщепленные (split-вакцины) или субъединичные вакцины

Препараты такого типа получают путем выделения протективных антигенов и их очистки от балластных веществ. Обычно они содержат очищенные или частично очищенные белки, полисахариды и липиды микроорганизмов, полученные после их разрушения.

Расщепленные вакцины готовятся, как правило, из поверхностных структур (клеточных мембран, капсидов и др.), содержащих протективные антигены. Для дезинтеграции микроорганизмов могут быть использованы протеолитические и липолитические ферменты, органические растворители, щелочи, детергенты, которые «мягко» разрушают мембранные структуры, не повреждая отдельные субъединицы.

Очистку полученных субъединиц проводят гель-фильтрацией или скопростным центрифугированием. Простейший метод отделения субъединиц от нежелательных остатков микроорганизмов — адсорбция на гидрате окиси

алюминия при определенном уровне рН. Надосадочную жидкость после центрифугирования удаляют, гидроокись алюминия с адсорбированными субъединицами ресуспенсируют в нужном разбавителе.

Разработка субъединичных вакцин преследует цель снижения их реакто-генности, а также избавления от балластных антигенов, не оказывающих влияния на протективные свойства вакцины [10, 19].

### ДНК-вакцины

Другой потенциально полезной стратегией иммунизации является внутримышечное или внутрикожное введение плазмидной ДНК, кодирующей протективные антигены микроорганизмов. Это направление получило название «генетическая иммунизация» или «иммунизация нуклеиновыми кислотами». Принцип этой технологии заключается в том, что в организм вводят не антиген, а ДНК, кодирующую этот антиген (белок).

ДНК-вакцины обычно содержат плазмиду *E. coli* с сильным промотором и репортерный ген. Плазмиды, амплифицированная в *E. coli*, очищается, сусpendируется в буферном растворе, а затем просто вводится в организм.

Преимущество ДНК-вакцин заключается в чистоте, физико-химической стабильности, включении в одну плазмиду генов, кодирующих множество антигенов, и экспрессии антигенов в их нативной форме (что облегчает процессинг и презентацию их иммунной системе). Повторное введение ДНК-вакцин не сопровождается интерференцией, кроме того, они эффективны в присутствии материнских антител. Главным недостатком ДНК-вакцин является возможная опасность, связанная с введением чужеродной гене-

тически измененной ДНК, что может привести к мутагенезу, онкогенезу, развитию аутоиммунных заболеваний или толерантности.

Плазмиды используют из-за отсутствия репликации и, более того, из-за отсутствия саморепликации ДНК при использовании ее в качестве вакцины. Плазмиды, содержащие вирусную ДНК, конструируются без последовательностей, которые способны интегрировать ее в хромосомальную ДНК [10, 16].

### Синтетические пептидные вакцины

Синтетические пептидные вакцины — препараты, содержащие искусственно синтезированные короткие пептиды, имитирующие небольшие участки протективных антигенов микроорганизмов, способные вызывать специфический иммунный ответ организма и защищать его от конкретного заболевания.

Значительные исследования в этой области проведены на модели вириуса ящура. Была создана вакцина, содержащая пептид 141-160 VP1 и адьювант Фрейнда. Вакцина вызывала образование вируснейтрализующих антител у морских свинок, свиней и крупного рогатого скота и защищала их от заболевания при заражении вирулентным штаммом ящура. Однако уровень гуморального иммунного ответа после вакцинации пептидным препаратом был в 10–100 раз ниже, чем после иммунизации цельным вирионом.

Несмотря на перспективность данного направления и некоторые полученные положительные результаты, большая часть работ по созданию пептидных вакцин показали весьма скромные результаты, поскольку для развития полноценного иммунного ответа требуется не только аминокислотная последовательность, но и конформация пептидов [10, 16, 17].

## Конъюгированные вакцины

Полисахариды относятся к Т-независимым антигенам, они обладают слабой иммуногенностью и слабой способностью к формированию иммунологической памяти. Иммуногенные свойства полисахаридов резко усиливаются, если их конъюгировать с белковым носителем.

В медицинской практике существуют две конъюгированные вакцины: вакцина против гемофильной инфекции и менингококковая вакцина группы С. Вакцины представляют собой конъюгат полисахарида, полученного из возбудителя, и белкового носителя (дифтерийного или столбнячного анатоксина). Носитель в силу его мо-

дификации полисахаридом и низкой концентрации в вакцине не вызывает сильной иммунологической реакции на себя [16, 19].

Несмотря на перспективность новых направлений в области разработки и создания вакцин, на сегодняшний день наиболее востребованными остаются классические инактивированные вакциновые препараты (включая анатоксины), а также живые и рекомбинантные субъединичные вакцины (Приложение 1). Связано это в первую очередь с тем, что только эти типы вакцин несут в себе полноценные антигены, по своему строению и структуре наиболее близкие к конкретному возбудителю инфекционного заболевания [19].

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Примеры разных типов вакцин против основных инфекционных заболеваний КРС, зарегистрированных для применения на территории РФ

Наименование препарата	Тип вакцины	Адьювант (при необходимости)	Страна происхождения
<b>КОМБОВАК</b> Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней крупного рогатого скота	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
<b>КОМБОВАК-А</b> Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и адено-вирусной инфекции крупного рогатого скота	инактивированная	масляный адьювант	Россия
<b>КОМБОВАК-Р</b> Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеитов, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
<b>КОМБОВАК-К</b> Вакцина инактивированная комбинированная против вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и эшерихиоза крупного рогатого скота	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
<b>КЛОСТБОВАК-8</b> Вакцина против клоストридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия

<b>Бови-шилд Голд FP5 L5</b> Вакцина против ринотрахеита, вирусной диареи (типы 1 и 2), парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и лептоспироза КРС пяти серогрупп	живая	не требуется	США
<b>Инфорс 3</b> Живая вакцина для профилактики респираторно-синцитиальной инфекции, ринотрахеита и парагриппа-3	живая	не требуется	США
<b>Кэтлмастер Голд FP5 L5</b> Вакцина профилактики инфекционного ринотрахеита; вирусной диареи КРС (типы 1 и 2); парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота и лептоспироза КРС пяти серогрупп	живая	не требуется	США
<b>Скоугард 4КС</b> Вакцина для против рота-, коронавирусной инфекций крупного рогатого скота, эшерихиоза и клоstrидиоза КРС	инактивированная	quil a	США
<b>Ультрачойс 8</b> Вакцина для профилактики клоstrидиозов у КРС и овец	инактивированная	сапонин, сульфат калия и алюминия	США
<b>Ван Шот Ультра 8</b> Вакцина для профилактики клоstrидиозов и пастереллеза крупного рогатого скота	инактивированная	стимуген	США
<b>КОГЛАВАКС</b> Вакцина против клоstrидиозов крупного рогатого скота и овец	инактивированная	гидроокись алюминия	Франция
<b>СТАРТВАК</b> Вакцина против мастита КРС	инактивированная	жидкий парафин	Испания
<b>ТОКСИПРА ПЛЮС</b> Вакцина против клоstrидиозов КРС	инактивированная	гидроокись алюминия	Испания
<b>ХИПРАБОВИС IBR</b> Вакцина против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, живая маркированная	живая	не требуется	Испания
<b>ХИПРАБОВИС БАЛАНС</b> Комбинированная вакцина против вирусной диареи, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции	живая	не требуется	Испания
<b>ХИПРАБОВИС-4</b> Комбинированная вакцина против ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота	живая	не требуется	Испания
<b>Ротавек® Корона</b> Инактивированная вакцина против диареи телят	инактивированная	гидроокись алюминия с добавлением минерального масла	Нидерланды
<b>Бовилис Виста Once SQ*</b> Вакцина для профилактики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллеза крупного рогатого скота	живая	не требуется	Нидерланды
<b>Бовилис® Бовипаст RSP</b> Вакцина для профилактики парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллеза крупного рогатого скота	инактивированная	гидроокись алюминия, сапонин	Нидерланды

<b>Бовилис® IBR маркированная</b> Вакцина для профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота	живая	не требуется	Нидерланды
<b>Бовилис® BVD</b> Для вакцинации КРС против вирусной диареи	инактивированная	гидроокись алюминия, фосфат алюминия	Нидерланды
<b>Бовилис Виста 5 SQ*</b> Вакцина против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи типов 1 и 2, респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота	живая	не требуется	Нидерланды
Вакцина ассоциированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и коронавирусной инфекции КРС инактивированная эмульсионная	инактивированная	масляный адьювант	Россия
Вакцина ассоциированная против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота эмульсионная инактивированная	инактивированная	масляный адьювант	Россия
Вакцина против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота сорбированная инактивированная	инактивированная	гидроокись алюминия и сапонина	Россия
Вакцина против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи КРС эмульсионная инактивированная	инактивированная	масляный адьювант	Россия
Вакцина против ротавирусной и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота сорбированная инактивированная	инактивированная	гидроокись алюминия и сапонин	Россия
Вакцина против ротавирусной, коронавирусной инфекции и вирусной диареи КРС эмульсионная инактивированная	инактивированная	масляный адьювант	Россия
<b>Антокс 9</b> Вакцина против клоストридиозов сельскохозяйственных животных инактивированная	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
Вакцина против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота культуральная живая сухая	живая	не требуется	Россия
<b>Тривак</b> Вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота	живая	не требуется	Россия
<b>Эмкар</b> Вакцина против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
<b>УНГОВАК FN</b> Вакцина против некробактериоза животных	инактивированная	полисахаридный адьювант	Россия
Вакцина против некробактериоза животных	инактивированная	масляный	Россия
Вакцина против некробактериоза животных	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
<b>Нековак</b> Вакцина против некробактериоза конечностей крупного рогатого скота	инактивированная	гидроокись алюминия	Россия
Формол-эмulsionная вакцина против некробактериоза крупного рогатого скота	инактивированная	масляный адьювант	Россия

## **IV. АНТИГЕНЫ. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА**

Главным и основным компонентом любого вакцинного препарата является антиген(ы) [4].

Антигены — структурно чужеродные для данного конкретного организма вещества, способные вызывать развитие специфического иммунного ответа, направленного на их удаление. В этом определении скрыты две основные характеристики антигена: его антигенная специфичность — свойство, отличающее данный антиген от индивидуального антигенного состава реципиента, и его иммуногенность — способность инициировать иммунную систему к формированию эффекторов, нейтрализующих антигенную чужеродность. Иммуногенность антигена определяется следующими свойствами: чужеродностью для организма, молекулярной массой и химическим строением [4, 11, 38].

**Чужеродность.** Для того чтобы молекула выступила в качестве иммуногена, она должна быть распознана иммунной системой как «не своя», т.е. «чужая». Главными носителями признаков чужеродности у разных микроорганизмов (вирусы, бактерии, грибы, простейшие) считаются патогенассоциированные молекулярные структуры — паттерны (ПАМП). Патогенассоциированные молекулярные паттерны незначительно различаются у разных патогенов, но отсутствуют у многоклеточных организмов.

**Молекулярная масса.** В многочисленных экспериментах показана зависимость между размерами антигена и силой иммунного ответа. Все корпукскулярные антигены (бактерии, гетерологичные эритроциты) — хорошие иммуногены. Для белковых антигенов иммунный ответ будет тем сильнее, чем больше его молекулярная масса.

**Химическое строение** антигена также оказывает существенное влияние на его иммуногенные свойства. Так, антиген распознается Т-хелперами на поверхности антигенпрезентирующей клетки (АПК), где он экспрессируется в иммуногенной форме в комплексе с продуктами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) после переработки гидролитическими ферментами. Если ферменты лизосом не способны деградировать макромолекулы антигена, то они остаются неиммуногенными или слабоиммуногенными. Ферменты макрофагов разрушают белки, построенные из L-аминокислот, и остаются инертными к их D-изомерам. В связи с этим синтетические полимеры, построенные из D-аминокислот, обладают слабыми иммуногенными свойствами.

Каждый антиген, как правило, содержит несколько детерминант (эпитопов), представляющих собой минимальные участки молекулы антигена, вызывающие иммунный ответ и определяющие его специфичность. Антитела или антигенраспознающие рецепторы Т- и В-клеток взаимодействуют не с целой антигенной молекулой, а с отдельными ее эпитопами. Имеются различия между Т- и В-эпитопами, которые могут находиться на одной и той же молекуле антигена. В-клеточные эпитопы, как правило, находятся на внешней поверхности молекулы антигена и относятся к так называемому конформационному типу, т.е. обладают третичной структурой и составляют часть общей пространственной организации антигенной молекулы. Т-клеточные эпитопы преимущественно располагаются внутри свернутой молекулы антигена, включают большое число аминокислотных остатков по сравнению с В-эпитопами и относятся к «линейному» типу, поскольку для их распознавания не требуется сохранения пространственной организации. В состав

В-эпитопов входят остатки гидрофильных аминокислот, а Т-эпитопы состоят из остатков гидрофильных и гидрофобных аминокислот [2, 4, 16, 19, 38].

Большинство природных антигенов является тимусзависимыми, т.е. полноценное развитие специфического иммунного ответа к таким антигенам возможно только при участии Т-клеток. Однако имеется группа антигенов, получившая название тимуснезависимых, которые способны инициировать специфический иммунный ответ в отсутствие Т-клеток. Это в основном полисахариды, и характеризуются они многократным повторением структурно идентичных эпитопов. Подобная структурная организация обеспечивает многоточечное взаимодействие с В-клеткой и, как следствие, ее полноценное развитие до зрелого плазмоцита без участия Т-клеток. Кроме того, в структуре некоторых тимуснезависимых антигенов (бактериальные липосахариды) имеются последовательности с поликлональной, митогенной активностью, что также может привести к самостоятельной активации В-клеток.

Однако потенциальная способность антигена к иницииции иммунного ответа может остаться нереализованной, если иммунизируемый организм по каким-либо причинам не способен воспринимать чужеродную информацию. Одно из требований к отвечающему организму — наличие соответствующих генов иммунного ответа (Ig-генов) [11, 18, 38].

### Бактериальные антигены

Бактерии — одноклеточные прокариотические организмы, окруженные цитоплазматической мембраной, за пределами которой находится толстая, богатая углеводами клеточная стенка и связанные с ней белковые структуры, капсула,

пили и жгутики. Клеточная стенка грам-положительных бактерий в основном состоит из пептидогликана (членыющиеся цепи N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, сшитые короткими пептидными цепями).

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий состоит из тонкого слоя пептидогликана, покрытого внешней мембраной, состоящей из липополисахаридов. Антигеннность грамотрицательных бактерий во многом связана сенным липосахаридом, который состоит из олигосахарида, присоединенного к липиду (липид А) и к нескольким повторяющимся трисахаридам. Многие бактерии классифицируются в соответствии с этой антигенной структурой, которая получила общее название О-антителов (рис. 42).

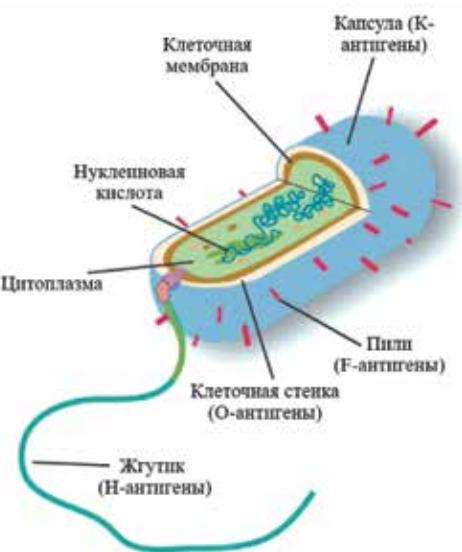


Рис. 42. Типичная структура бактерии и локализация наиболее важных антигенов (Veterinary Immunology, Ian R. Tizard et al., 2018)

Капсула бактерий состоит в основном из полисахаридов, которые являются хорошими антигенами, получившими общее название К-антителов.

Пили и фимбрии — короткие выступы на поверхности некоторых грамотрицательных бактерий — классифицируются как F- или K-антителы. Пили играют важную роль в перемещении бактерий, а также их коньюгации между собой. Фимбринги отвечают за адгезию бактерии к поверхности клеток. Антитела к фимбримальным белкам могут быть защитными, поскольку способны предотвращать прилипание бактерий к поверхностям тела животного.

Жгутики бактерий — длинные нитеподобные отростки, необходимые для их движения. Состоят из одного белка — флагеллина. Жгутиковые антигены получили общее название Н-антителы.

Другие важные бактериальные антигены включают белки теплового шока и экзотоксины.

Белки теплового шока вырабатываются в больших количествах у бактерий в стрессовых ситуациях — как правило, при неблагоприятных факторах окружающей среды (температура и др.).

Экзотоксины — токсичные белки, секретируемые бактериями при жизни или выделяемые в окружающую среду при их гибели. Экзотоксины являются высокоиммуногенными белками [38].

### **Вирусные антигены**

Вирусы — мелкие «облигатные» внутриклеточные паразиты, состоящие из ядра (содержит нуклеиновую кислоту), покрытого белковым слоем, получившим название капсид. Белки капсида являются ярко выраженным антигенами. Некоторые вирусы имеют дополнительные оболочки, состоящие из липо- и гликопротеинов, которые также обладают антигенными свойствами.

Вирусы, проникая в организм животного, встречаются защитными механизмами врожденного иммунитета, при этом часть вирусных частиц под-

вергается разрушению, высвободившиеся вирусные белки распознаются и презентируются иммунокомпетентными клетками, запуская реакции адаптивного иммунного ответа.

Вирусы, которые проникают внутрь клеток хозяина, не доступны воздействию антител. Однако, встраивая в геном клетки свою нуклеиновую кислоту, они инициируют синтез собственных вирусных белков, которые являются чужеродными для макроорганизма, т.е. могут выступать в качестве антигенов. Часть из них экспрессируются на поверхности инфицированных клеток и становятся доступными для распознавания иммунокомпетентными клетками, тем самым запуская иммунологические реакции в организме животного [38].

## **Литература**

1. Борзенко Е.В. Количественная характеристика иммуноглобулинов в биологических жидкостях крупного рогатого скота методами иммунохимического анализа. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2005.
2. Верховский О.А. Поли- и моноклональные антитела в анализе гуморального иммунного ответа, структуры и функциональных свойств иммуноглобулинов животных. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1998.
3. Воронин Е.С. и др. Иммунология. М.: Колос-пресс. 2002; 89.
4. Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Академия. 2004; 216с.
5. Зверев В.В., Хайтов Р.М. и др. Вакцины и вакцинация. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2014.
6. Зверев В.В., Быков А.С. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: «Медицинское информационное агентство». 2016.

7. Зеркалев Д.Ю. Разработка средств специфической профилактики и лечения вирусной геморрагической болезни кроликов в Краснодарском крае (Получение и применение сыворотки и инактивированной вакцины с различными адьювантами). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2004; 19.
8. Клюкина Н.Д. Полиакриловая кислота как адьювант в противоящурной вакцине. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Владимир, 2007; 16.
9. Львов Д.К. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: Медицинское информационное агентство. 2013.
10. Медуницаин Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х. 2004; 146.
11. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Основы противовирусного иммунитета. М.: «ЗооВетКнига». 2015.
12. Петров Р.В., Хайтов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2011.
13. Прохорягтова Е.В., Бабкин М.В., Борисова Е.Л., Кольчик Е.В., Годовский А.В., Явников Н.В. Изучение токсических и иммуногенных свойств различных адьювантов на модели вируса классической чумы свиней. Труды международной научно-практической конференции посвященной 50-летию ВНИИВВиМ. Покров. 2008; 144–147.
14. Самуйленко А.Я. и др. Адьюванты. М.: ВНИТИБП. 2016.
15. Сафонов Н.А., Фомина В.Д. Физиология иммунной системы. М.: Издво МВА. 2002; 24.
16. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика. 2007.
17. Хайтов Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013.
18. Шамшева О.В., Учайкин В.Ф., Медуницаин Н.В. Клиническая вакцинология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
19. Шемельков Е.В. Влияние различных типов адьювантов на эффективность вакцин против инфекционных болезней свиней. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2010.
20. Шемельков Е.В., Верховский О.А. Сравнительная оценка активности вакцины против рожи свиней при использовании в ее составе различных адьювантов. Труды ВИЭВ. М. 2009; 75: 666–669.
21. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 8th ed. ELSEVIER. 2015.
22. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. ELSEVIER. 2017.
23. Apostólico J., Lunardelli V., Coirada F., Boscardin S., Rosa D. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. J. Immunol. Res. 2016.
24. Aucouturier J., Dupuis L., Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine. 2001; 19: 2666–2672.
25. Beacock-Sharp H., Donachie A.M., Robson N.C., Mowat A.M. A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ Tlymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. Int. Immunol. 2003; 15: 711–720.
26. Blowey R.W., Weaver A.D. Color atlas of diseases and disorders of cattle. ELSEVIER. 2011.
27. Burmester G.R., Pezzutto A. Color atlas of immunology. Перевод под ред. Проф. Л.В. Козлова. М.: «БИНОМ». 2014.
28. Day M.J., Schultz R.D. Veterinary Immunology — Principles and Practice. 2nd ed. Department of Pathobiological Sciences School of Veterinary Medicine University of Wisconsin-Madison. USA. 2014.
29. Deville S., Laval A., Parker R. Adjuvant formulation for influenza H1N1 and H3N2 pig vaccine. Vaccine. 2009; 7: 451–457.

30. Dey A.K., Burke B., Sun Y. Use of a polyanionic carbomer, Carbopol971P, in combination with MF59, improves antibody responses to HIV-1 envelope glycoprotein. *Vaccine*. 2012; 30(17): 2749–2759.
31. Freund, Casals J., Hosmer E. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle J. bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1937; 37: 509–513.
32. Gartlana H., Krashiasa G., Wegmann F. et al. Sterile inflammation induced by Carbopol elicits robust adaptive immune responses in the absence of pathogen-associated molecular patterns. *Vaccine*. 2016; 34: 2188–2196.
33. Gasper D.J., Neldner B., Plisch1 E.H., Rustom H. et al. Effective Respiratory CD8 T-Cell Immunity to Influenza Virus Induced by Intranasal Carbomer-Lecithin-Adjuvanted Nonreplicating Vaccines. *PLoS Pathog.* 2016; 12(12): e1006064.
34. Glenny A.T., Pope C.G., Waddington H., Wallace U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1926; 29: 38–45.
35. Male D., Keynes M., Roth D.B., Roitt I.M. *Immunology*. 8<sup>th</sup> ed. ELSEVIER. 2013.
36. Peek S.F., Divers T.J. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. ELSEVIER. 2018.
37. Sastry M., Zhang B., Chen M. et al. Adjuvants and the vaccine response to the DS-Cav1-stabilized fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *PLoS One*. 2017; 12(10): e0186854.
38. Tizard I.R et al. *Veterinary Immunology*. 9<sup>th</sup> ed. ELSEVIER. 2013.

## IV. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НА ЗАЩИТЕ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Забережный А.Д., Алипер Т.И.

Продолжительность нашей жизни возросла не только в количественном летоисчислении — возросло число научных прорывов и технологических революций, переживаемых за отпущеный человеку земной век. Сегодня отец не может передать сыну своё ремесло — оно устареет прежде, чем вырастет сын. На первый план выходит необходимость постоянного обучения и анализа стремительного развития материальной жизни. Всё это в полной мере относится к технологиям, применяемым в медицине и ветеринарии. Совсем недавно, в середине XX века, стало известно, что и состояние и развитие организма в конечном счёте записано в генетическом коде ДНК и РНК — человека, животных и их окружающих паразитов, растений, грибов,

бактерий, вирусов. Стержневым стало открытие строения ДНК в виде двойной спирали. Было изучено строение генов, и возникла генетическая инженерия. Расшифровывать генетическую последовательность (секвенирование) начали с 1979 года, а чуть позже появилась полимеразная цепная реакция (ПЦР). Её появление позволило количественно синтезировать требуемый фрагмент ДНК и сделало ненужными многие сложные методы, созданные генными инженерами. Описанные революционные технологии появились и вошли в обиход за одно десятилетие. Они словно сняли покров с огромного массива знаний, накопленных микробиологами, вирусологами, селекционерами, врачами, генетиками за предыдущие столетия.



### Стремительный рост молекулярных методов

- 1979 – начало анализа первичной структуры генов
- 1980 – за расшифровку 1 гена дают учёную степень
- 1990 – появилась ПЦР
- 1995 – расшифровка полного вирусного генома – обсуждаемое событие
- 1997 – появились инфекционные ДНК-клоны вирусов
- 2000-2005 – включились суперкомпьютеры
- 2005 – хорек, зараженный маркированным вирусом, светится в ультрафиолетовых лучах, видно распределение вируса в органах и тканях

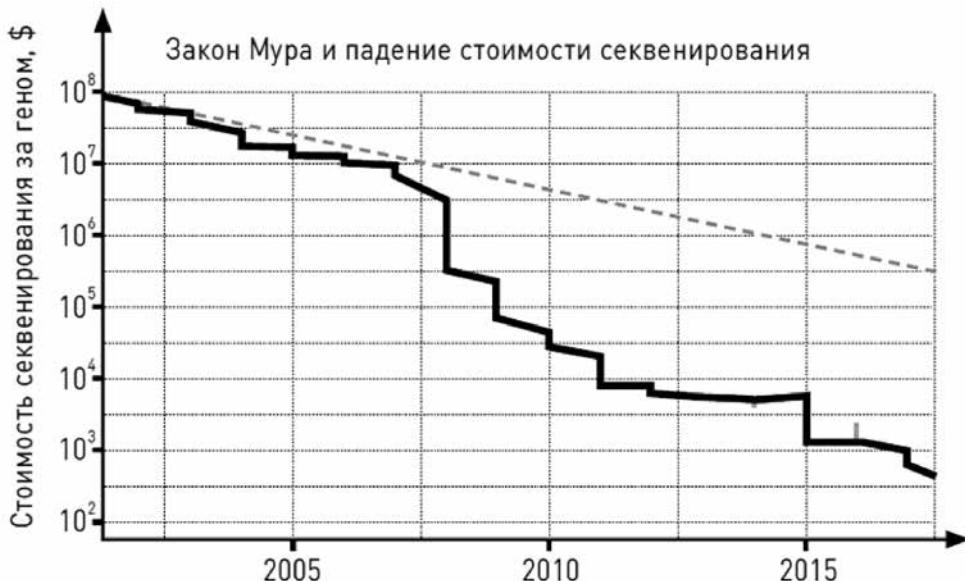


В лабораторной диагностике устойчиво применяется сочетание ПЦР и секвенирования. За почти три десятилетия были внесены модификации — секвенирование стало капиллярным и роботизированным. Возросло количество нуклеотидов, прочитываемых в одном условном капилляре: от десятков на заре развития технологии, до тысяч сегодня. Кратно уменьшилась стоимость процесса, что перевело его в разряд услуг, оказываемых специализированными фирмами. Тем не менее ещё на несовершенных приборах была расшифрована структура генома человека, всего 3,1 миллиарда нуклеотидов — эпохальное достижение, дающее принципиально новый импульс в развитии медицины и фармакологии.

Сегодня технология переживает новое качественное изменение — появилось «секвенирование нового поколения». Эта технология позволяет на несколько порядков увеличить количество расшифровываемой ДНК, а главное, интерпретацию полученных данных. Если сегодня мы можем расшифровывать последовательности ДНК на персональ-

ном компьютере, то миллиарды нуклеотидов способен проанализировать лишь суперкомпьютер с искусственным интеллектом и невероятным быстродействием. В результате стало возможным расшифровывать геном каждого человека в качестве стандартной медицинской процедуры. Стоимость процесса неуклонно снижается, несомненно, он станет массовым и сделает морально устаревшими сегодняшние подходы, основанные на классическом секвенировании.

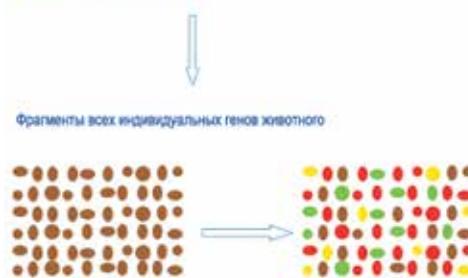
Модификации претерпевают и другие методы молекулярной диагностики, такие как ПЦР в реальном времени и микрочипы. Будут ли они востребованы? По-видимому, в ближайшем будущем они будут развиваться. В особенности это касается микрочипов, которые созданы для анализа генной активности человека и разных видов животных. Пока нет альтернативы этому эффективному изобретению. Особенность метода заключается в том, что на микрочип наносят все до одного гены от одного вида, например телёнка. Микрочип применяется для анали-



за информационных РНК, выделенных от каждого исследуемого животного — только те гены проявляются, которые активны. Данная информация важна не только для диагностики и оценки физиологического состояния, но и для фундаментальных исследований по биохимии, которые находятся в начале пути. При всей простоте методики, создание микрочипа было бы невозможным без полной расшифровки и синтеза всех генов свиньи. Речь идёт о десятках тысяч проанализированных индивидуальных открытых рамок считывания ДНК. Сегодня создание подобных микрочипов происходит во всём мире для многих биологических видов, результаты их применения и новые технические модификации будут доступны в ближайшем будущем.

### Технология микрочипов (биочипов)

«Тотальный тип» (тысячи пятен)



В результате расшифровки генома человека обнаружили 20–25 тысяч активных генов, при том, что у плодовой мушки дрозофилы их 13 600, а у нематоды *Caenorhabditis elegans*, не превышающей в длину 1 мм, их оказалось 19 500. По сложности своей организации человек должен был иметь не менее 100 тысяч активных генов. Наш организм развивается в симбиозе с одноклеточными организмами, количество которых примерно соответствует количеству соматических клеток человека, а по геному разнообразию — превосходит наш геном на несколько порядков.

Совокупность одноклеточных симбionтов называется «микробиом». Мы приобретаем его при рождении через контакты с кожной, вагинальной и кишечной микрофлорой матери. После появления новейших технологий стало возможным расшифровать всё генетическое содержание нашего микробиома. Оно практически не изменяется в течение всей жизни, несмотря на воздействия антибиотиков и контакты с посторонней микрофлорой. Таким образом, микробиом можно считать частью организма хозяина, а его гены влияют на свойства хозяина не меньше, чем собственные гены.

Интересным подтверждением этого тезиса стало исследование генетических факторов предрасположенности к бронхиальной астме. Для этого провели исследование среди двух североамериканских фермерских общин — амишей и хуттеритов. Они переехали из одного региона Европы в 1700–1800 годах и с тех пор жили в разных штатах, не имея контактов. Разница между ними была в том, что амиши отказались от использования машин и электричества и вели хозяйство старинным способом. Хуттериты, несмотря на традиционный образ жизни, использовали все современные технологии в сельском хозяйстве. При этом у двух общин была ярко выраженная разница в уровне заболеваемости астмой — 5,2% у амишей против 21,3% у хуттеритов, а также аллергией — 7,2% против 33,3%. Где же была генетическая разница между представителями двух общин? В хромосомах человека разницы не нашли, а нашли в микробиомах. Для подтверждения этой гипотезы микробиомы от детей из этих общин внедрили в мышат-гнотобиотов. Оказалось, что мышата, получавшие микробиом от детей амишей, устойчивы к аллергии и астме, в отличие от мышат с микробиомом от детей хуттеритов.



### Амиши

Мигрировали из Швейцарии на восток США

Численность на сегодня 270 тысяч человек

Животных держат на своих дворах

Передвигаются гужевым транспортом

Не используют электропитание

Женщины и дети ухаживают за животными

У детей частота заболеваемости

астмой – 5,2%

аллергией – 7,2%



### Хуттериты

Мигрировали из Южного Тироля на запад США

Численность на сегодня около 45 тысяч человек

Мужчины работают на современных фермах

Передвигаются на автомобилях

Пользуются современными технологиями в быту

Женщины и дети не имеют контакта с животными

У детей частота заболеваемости

астмой – 21,3%

аллергией – 33,3%.

Таким образом, экспериментально доказано, что генетический состав микробиома влияет на важные фенотипические свойства организма не в меньшей степени, чем прямая наследственность. Эти наблюдения открывают новую тенденцию — лечение болезней и генетическую коррекцию здоровья при помощи воздействия на микробиом человека и животных.

Новые технологии привели к прорывным открытиям в вирусологии. Вирусология как наука берёт своё начало от открытия Д.И. Ивановским вируса табачной мозаики в 1892 г. Полагая, что имеет дело с бактериальной инфекцией, он пропустил инфекционный материал через фильтр, отсекающий бактерии. К его удивлению, инфекционная активность не исчезла. Так были открыты невидимые в микроскоп «фильтрующиеся микроорганизмы», которые к тому же невозможно было размножить в питательных средах. Вирусы способны размножаться только внутри живой клетки, а название эти внутриклеточные паразиты получили от латинского слова *virus* — яд. После открытия

Ивановского были выявлены вирусы ящура (1897), желтой лихорадки (1901), натуральной оспы (1907), полиомиелита (1909) и др. Первые попытки классификации вирусов, предпринятые в 1960-е годы, основывались на анализе вирусного фенотипа и структурных свойствах вириона. Со временем Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) доработал формулу классификации вирусов, включив в неё эволюционную историю вирусных таксонов. Этих таксонов пять: отряд, семейство, подсемейство, род и вид. С тех пор периодически выходят доклады ICTV с внесёнными изменениями в схему классификации вирусов. В виде последнего большого печатного труда в 2011 г. вышел 9-й доклад ICTV, который содержит подробное описание свойств вирусов и является ценным справочным материалом для вирусологов. Последний доклад вышел в 2015 г. В этом году ICTV изменил отношение к определению вирусных видов, а также остановил работу над базой данных, содержащей описания вирусов. Это символизировало окончание работы по

схеме классификации вирусов, которая длилась более века. С тех пор количество известных вирусов кратно возросло, они получают цифровые названия и их постоянно увеличивающийся список невозможно выпускать в печатном виде из-за слишком большого объёма информации и быстрых пополнений. В связи с этим мы сочли возможным на рисунке снизу привести данные ICTV о вирусных таксонах (семействах и родах) на 2015 г.

#### Царство Virae

3694 вида вирусов

641 род,  
27 подсемейств,  
114 семейств  
7 отрядов.

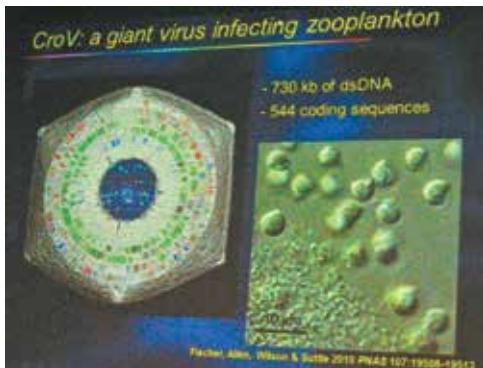


**Количество известных вирусных таксонов по традиционной классификации на 2015 г.** Этим данные собраны вирусологами всего мира за столетие классических исследований. В последние годы количество вновь открываемых вирусов с использованием новых технологий кратно возросло

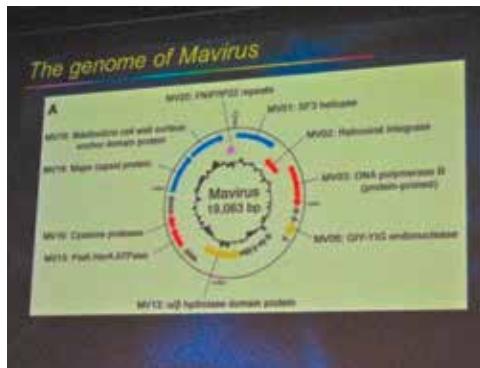
В мировом океане обнаружили вирусы, паразитирующие на одноклеточной микрофлоре. В океане вирусы размножаются во всех морских организмах, от китов до планктона и бактерий. Микроорганизмы составляют 95–98% биомассы океана. Они ответственны за синтез половины атмосферного кислорода. В океане вирусы превосходят по численности все морские организмы. Для сообщества морских вирусов появился термин «виропланктон». По оценкам С.А. Suttle, количество вирусов в мировом океане составляет **10<sup>30</sup>**. Сдерживая бесконечный рост биомассы одноклеточных организмов мирового океана, вирусы количественно и качественно влияют на

самый нижний уровень трофической пирамиды, а через пищевые цепи — на всё живое на планете. Таким образом, эволюция вирусов является наиболее существенным фактором, влияющим на эволюцию всей биосферы. Открытие одни из самых больших ДНК-содержащих вирусов относятся к роду *Mimivirus*, они имеют размер 0,75 мкм, видны в обычном микроскопе, поэтому их какое-то время считали внутриклеточными паразитирующими бактериями. Геном содержит 1,18 миллиона пар нуклеотидов. Описано 979 генов, кодирующих белки, — более, чем у всех ранее известных вирусов. В их число входят ферменты (нуклеотиддифосфаткиназа), что нехарактерно для вирусов. Представитель данного рода, *Cafeteria roenbergensis*, является хозяином для вирофагов, которых обнаруживают вместе с ними. Вирофаги считаются предшественниками ДНК-транспозонов. Вирофаг *Mavirus*, кодирующий 20 белков, включая ретровирусную интегразу, имеет высокую степень генетической гомологии с эукариотическим транспозоном *Maverick/Polinton*.

Это напрямую указывает на участие вирусов океана в эволюции эукариот. Новые свойства открыты у вирусов диатом — самого распространенного типа фитопланктона. Диатомы являются собой основу жизни в океанах и отвечают за четверть мирового производства растительной продукции. Отличительной особенностью РНК-вирусов диатом является их множественность репродукции — более 20 тысяч вирусных частиц на одну клетку хозяина, накопление вируса при культивировании составляет 1010 частиц в мл. Основные сведения о вирусах океана накоплены с появлением молекулярных технологий, позволяющих определять фрагменты нуклеотидных последовательностей вирусных геномов без предварительного культивирования и изоляции вирусов. Проана-



A



Б

#### **А. Схематическое изображение и фото гигантских вирусов, инфицирующих зоопланктон.**

#### **Б. Геномная карта впервые открытого вирофага, паразитирующего в других вирусах и несущего гены человека**

лизированы миллиарды нуклеотидных последовательностей. Из них 4,7% идентифицированы, 3,9% имеют сходство с известными последовательностями, 91,4% ранее неизвестны. Вирусы океана, имеющие одноцепочечный ДНК-геном, на 90% неизвестны. Оставшиеся 10% составляют семейства *Circoviridae* (5,20%), *Nanoviridae* (2,10%), *Microviridae* (1,75%), а также *Geminiviridae*, *Parvoviridae*, *Inoviridae*. Таким образом, половину идентифицированных вирусов океана с одноцепочечным ДНК-геномом составляют цирковирусы, родственники которых повсеместно распространены в мире среди домашних свиней.

Вирусы лежат на границе «живого» и «неклеточного», это неклеточные формы жизни, способные проникать в живые клетки и размножаться только внутри них. Собрать инфекционный вирус *in vitro* сегодня не составляет труда (методами обратной генетики). Можно ли «синтезировать» живую клетку? Синтезирован полный геном микоплазмы, и на его основе получены воспроизводящиеся в бесклеточной среде бактерии. Микоплазмы отличаются от остальных бактерий отсутствием жесткой клеточной стенки. От вирусов микоплазмы отличаются способностью расти на бесклеточ-

ных средах и способностью метаболизировать ряд субстратов. Микоплазмы являются наиболее простыми живыми организмами, объём их генетической информации в 4 раза меньше, чем у *E. coli*. Геном *M. genitalium* содержит 482 гена и имеет размер 582,970 т.п.н. в виде одной кольцевой хромосомы — в 2 раза меньше, чем у крупного ДНК-вируса. Синтезирован также минимально возможный функционирующий геном микоплазмы из 382 генов и на его основе получены воспроизводящиеся в бесклеточной среде бактерии.



## **Первая синтезированная бактерия — *Mycoplasma laboratorium***

Синтез в лабораторных условиях реалирующих биологических объектов заставляет нас оглянуться назад и вспомнить о множестве учёных, от Т. Парацельса до О. Лепешинской, которые мечтали об этом.



Парацельс  
1493-1541

**«Дали ли природа и наука нам в руки средство, с помощью которого можно было бы произвести на свет человека без участия в том женщины. По-моему, это не противоречит законам природы и действительно возможно...»**



О.Б.Лепешинская  
1871 - 1963

**«Клетки не только могут, но закономерно в любом организме, и в особенности в начальных стадиях его развития, зарождаются из вещества, не имеющего структуры клетки...»**

Совокупность современных подходов привела к появлению концепции «синтетической биологии» — наиболее перспективного направления генной инженерии, которое занимается созданием принципиально новых «живых» систем. К ним будут относиться вакцины, продуценты лекарственных

средств, пищевых и других продуктов, например биотоплива, спирта, водорода, «живые» сенсоры для выявления определённых веществ, здоровая компонента микробиома человека для коррекции патологий — бактерии-

симбионты с лечебными функциями, «живые батарейки» для электропитания, биоинформационные процессы — участие в каскадах передачи информации, многое другое. Все эти революционные изменения должны встать на стражу здоровья человека и животных в XXI веке.

# V. БАКТЕРИИ И АНТИБИОТИКИ: МНОГОВЕКОВАЯ ИСТОРИЯ БОРЬБЫ

Севастьянова Т.В., Панин А.Н.

...Чем более подвигается наука в изучении причин болезни, тем более выступает то общее положение, что предупреждать болезни гораздо легче, чем лечить их...

И.И. Мечников



Инфекционные болезни — обширная группа нозологических форм болезней, вызываемых специфическими возбудителями, характеризующимися заразительностью, циклическим течением и формированием специфического иммунитета. Термин «инфекционные болезни» впервые ввел величайший немецкий врач своего времени Кристофф Вильгельм Гуфеланд (*Lebensbilder deutscher Ärzte. Lpz.*, 1963). Наиболее известный труд Гуфеланда — «Макробиотика» (1796 г.) — о факторах, влияющих на долголетие, и профилактике преждевременного старения; о нем будет упомянуто далее...

В понимании великого русского ученого И.И. Мечникова, «...инфекция есть борьба между двумя организмами». Приводя в пример распространенную в Аргентинской Республике болезнь телят, сопровождающуюся острым воспалением кишок, описанную в трудах доктора Линье (*Contribution altitude de*

*la diarre des jeunes bovides, Buenos-Aires, 1898*), который изучал подробно эту эпизоотию, И.И. Мечников подтверждает, что причиной ее является маленькая бактерия, развивающаяся главным образом в кишках.



В 1822 году Робертом Кохом впервые был сформулирован постулат доказательства связи болезни и микроорганизма.

Для того чтобы вырастить здоровое и продуктивное поголовье крупного рогатого скота, необходимо правильно ухаживать за животными. Болезни наносят животноводству значительный социально-экономический ущерб, включающий затраты на лечение и, как следствие, снижение показателей продуктивности.

Респираторные, гастроинтестинальные и урогенитальные болезни инфекционной этиологии занимают одно из ведущих мест в патологии крупного рогатого скота и рассматриваются как серьезная экономическая проблема современного животноводства. По статистике, на первом месте среди болезней молодняка крупного рогатого скота по-прежнему стоят болезни желудочно-кишечного тракта, на втором — поражения респираторного тракта, на третьем — болезни опорно-двигательного аппарата. На первом месте в структуре болезней новорожденных телят (в возрасте до 30 дней) стоят нарушения работы желудочно-кишечного тракта. Патологию регистрируют у 50–100% телят, гибель может достигать 55% от числа заболевших. Причинами заболеваемости молодняка и падежа по большей части становятся вирусные и бактериальные инфекции, а также их ассоциации.

По данным, полученным Паниным А.Н., Малик Н.И., желудочно-кишечные болезни телят и коров дойного стада приносят огромный ущерб скотоводству.

Проблема желудочно-кишечных болезней крупного рогатого скота, вызываемых бактериями, грибами, микотоксинами и кокцидиями, до сих пор не решена, несмотря на большое разнообразие лекарственных средств, представленных на рынке ветеринарных препаратов [5].

Респираторные болезни поражают преимущественно телят в возрасте от одного до четырех месяцев, протекают чаще энзоотически. Значительное распространение респираторные болезни телят получают в зимне-стойловый период, особенно в стационарно-неблагополучных хозяйствах, где переболевают 30–60% молодняка. В системе мер борьбы с респираторными болезнями широкое применение получили вакцинопрофилактика и различные химиотерапевтические средства [4].

Одной из самых распространенных болезней телят является бронхопневмония [8, 14].

В отдельных хозяйствах гибель молодняка от бронхопневмонии и других респираторных заболеваний в совокупности с вынужденным убоем достигает 40–55%, а привесы, т.е. окупаемость корма, у больных животных снижаются в 2–3 раза, что приводит к снижению экономической эффективности на 20–30% [15, 16].

Одной из причин снижения молочной продуктивности коров, санитарных и технологических свойств молока, а также преждевременной выбраковки животных является мастит [19, 2].

По общепризнанному мнению ущерб, наносимый данной патологией, складывается из потери молочной продуктивности (70,0%), преждевременной выбраковки животных (14,0%), ухудшения качества молока (8,0%), возрастаания расходов на лечение (8,0%).

Послеродовые эндометриты у коров являются одной из актуальных проблем ветеринарии. Болезни репродуктивных органов наносят большой экономический ущерб животноводству в связи со снижением продуктивности и племенной ценности животных, преждевременной их выбраковкой, значительными затратами на лечение, а также снижением качества продуктов питания [11].

Согласно исследованиям в последнее десятилетие послеродовые эндометриты вызывают в большинстве случаев не монокультуры, а ассоциации микроорганизмов.



Еще в 1797 году в книге «Искусство продлить человеческую жизнь» Гуфеланд повествует о том, что мы не излечиваем никогда, но сама природа излечивает болезни. Изучая эту книгу, многие ученые пришли к выводу, что для борьбы с болезнью и микроорганизмами необходимо обратиться к природе. И так началась вековая история поиска природных средств борьбы с инфекционными болезнями.

Первые антибиотики были выделены задолго до того, как стала известной их способность угнетать рост микроорганизмов. Так, в 1860 был получен в кристаллической форме синий пигмент пиоцианин, вырабатываемый небольшими подвижными палочковидными бактериями рода *Pseudomonas*, но его антибиотические свойства были обнаружены спустя много лет.

Впервые 1870 году в Англии сэр Джон Скотт Бурдон-Сандерсон начал наблюдения над свойствами плесени. Год спустя (1871–1872 гг.) сотрудники профессор Петербургской медико-хирургической академии В.А. Манассеин и ученый-микробиолог А.Г. Полотеб-

нов впервые использовали экстракти из культур плесневого гриба *Penicillium glaucum* для лечения гнойных ран. В это же время подобными исследованиями занимался английский ученый, хирург, создатель учения о хирургической антисептике Джозеф Листер.

Однако основы современного учения об антагонизме микробов и практического использования этого явления в медицине были заложены И.И. Мечниковым. Позднее, в 1875 году Джон Тинделл дал свои разъяснения антибактериальному действию гриба *Penicillium* на страницах журнала издательства Royal Society. Двумя годами позже во Франции Луи Пастер после продолжительных серий своих экспериментов описал антибиоз между бактериями почвы и патогенными бактериями — возбудителями сибирской язвы, предположив, что антибиоз может стать основой методов лечения.

Итальянским ученым-микробиологом Бартоломео Госио в 1896 г. из культуры плесени удалось кристаллизовать еще одно химическое вещество такого рода, получившее название мицофеноловая кислота. Это первый научно описанный в литературе антибиотик.

Через 20 лет, в 1897 году Эрнест Дюшен на защите диссертации «Антагонизм между плесенью и микроорганизмами» констатировал факт наличия веществ, которые могут привести к подавлению размножения некоторых патогенных бактерий. Через два года (1899) Оскар Лев и Рудольф Эммерих доказали, что бактерии, которые являются источниками одной болезни, могут быть выходом и лечением для другой болезни.

В 1885 году немецкий исследователь Пауль Эрлих предположил, что клетки макро- и микроорганизма имеют специфический рецепторный аппарат и поэтому избирательно взаимодействуют с различными химическими веществами,

что привело к новому подходу в лечении инфекционных болезней. Множество ученых трудились над выделением вещества, способного подавлять рост патогенных микроорганизмов.

Первый антибиотик — пенициллин был открыт английским микробиологом сэром А. Флемингом в 1929 г. при изучении культур стафилококков. Ученым было установлено, что культуры стафилококков на плотной питательной среде образуют зоны антагонизма, то есть задержки роста вокруг колоний плесневого гриба *Penicillium notatum*. При введении фильтрата лабораторным животным *P. notatum* задерживал рост различных бактерий, при этом и не вызывая их гибель. Более 10 лет он пытался получить пенициллин из культуральной жидкости для проведения клинического исследования, и удалось это сделать Э. Чейну и Г. Флори чуть позднее.

кислоту и получить её соль, стабильно сохраняющую свою антибактериальную активность.

В 1942 году термин «антибиотик» (от греч. *anti*, *bios* — ‘против жизни’) был предложен американским микробиологом С.А. Ваксманом для обозначения природных веществ, продуцируемых микроорганизмами и в низких концентрациях антагонистичных к росту других бактерий.

Результатом долгих исследований микроорганизма *Streptomyces griseus* С.А. Ваксманом стало открытие его учеником Альбертом Шатцом антибиотика стрептомицина.

Открытие антибиотиков в России произошло как раз после завоза пенициллина в СССР в конце 1930-х — начале 1940-х годов, когда их исследованием занималась З.В. Ермольева. При непосредственном участии Ермольевой уже в конце 1944 г. на базе фабрики



Sir Alexander Fleming  
(1881-1955)

Ernst Boris Chain  
(1906-1979)

Sir Howard Walter Florey  
(1898-1968)

В 1935 г. немецким ученым Г. Домагком были открыты синтетические производные сульфаниловой кислоты (сульфаниламидных препаратов).

В 1940-е годы английскому патологу Г. Флори и биохимику Э. Чейну удалось выделить нестойкую пенициллиновую

эндокринных препаратов в Москве был открыт экспериментальный цех, который начал выпуск жидкого концентрированного пенициллина [7].

Открытия первых антибиотиков дали толчок для проведения дальнейших анализов и изготовления многих новых

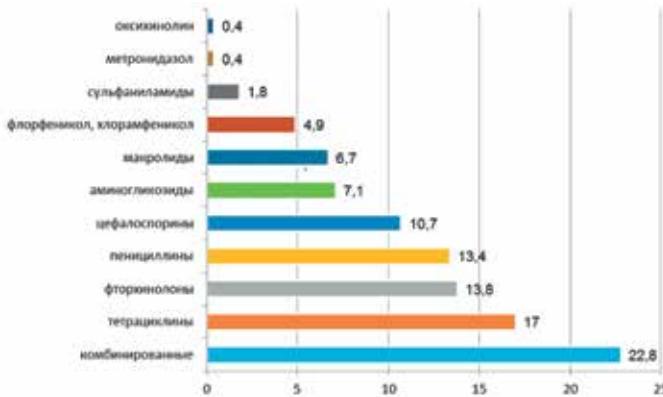
веществ. В связи с этим период между 1950 и 1970 годами стал поистине «золотой эрой» открытий новых классов антибиотиков.

Сегодня невозможно представить нашу жизнь без антимикробных препаратов, помогающих бороться с большинством инфекционных болезней [9].

Объём используемых в ветеринарии антимикробных препаратов для продуктивных животных более чем в 2 раза превышает объём лекарственных средств, применяемых в медицине. В России зарегистрировано более 2000 наименований антимикробных лекарственных средств, из них более 300 являются многокомпонентными. К ним относятся в том числе вакцины, сыворотки и диагностикумы (Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения) [29].

Из них 224 препарата (9,2%) относятся к противомикробным средствам, рекомендуемым фармацевтическими компаниями для лечения и профилактики различных заболеваний крупного рогатого скота, в том числе маститов и эндометритов.

Из них комбинированные препараты составляют 22,8%, препараты, содержащие тетрациклины, — 17, фторхинолоны — 13,8, пенициллины — 13,4, цефалоспорины — 10,7, аминогликозиды — 7,1, макролиды — 6,7, хлорамфеникол и флорфеникол — 4,9, сульфаниламиды — 1,8, метронидазол и производные оксихинолина — по 0,4%. Анализ составов комбинированных лекарственных препаратов, разработанных для лечения маститов у коров, свидетельствует о наибольшем включении в лекарственные формы пенициллинов (75%) и аминогликозидов (65%), далее по убывающей следуют тетрациклины (20%), цефалоспорины и производные хиноксалина (по 15%), линкозамиды (10%), макролиды и сульфаниламиды, которые составляют по 5% [3]. На ветеринарном фармацевтическом рынке зарегистрированы поликомпонентные лекарственные препараты (4 и более лекарственных веществ в лекарственной форме), применение которых требует особого обоснования с позиций рациональной химиотерапии [40]. Следует отметить, что масштабное приме-



Ассортимент противомикробных лекарственных препаратов, применяемых в молочном животноводстве

Бойко Т.В и Геруновой Л.К. представлены результаты анализа современного ассортимента противомикробных средств, разрешенных для применения в молочном животноводстве России.

Использование антимикробных препаратов в продуктивном животноводстве на фоне отсутствия полноценной системы фармакотерапевтического мониторинга неизбежно ведет к появлению их остат-

ков не только в молоке, но и объектах окружающей среды, снижению эффективности лечебных мероприятий, в том числе в гуманитарной медицине с использованием химиотерапевтических препаратов, что в свою очередь способствует формированию резистентности микроорганизмов [27, 41].

Несомненно, данные обстоятельства требуют изыскания новых подходов к лечению и профилактике болезней в молочном животноводстве. Однако до сих пор выбор эффективного и безопасного антибактериального препарата остается сложной задачей, что связано не только с ростом устойчивости бактериальной флоры, но и зачастую с невозможностью идентификации возбудителя заболевания, установления его чувствительности к химиотерапевтическим лекарственным средствам, а также с действием разнообразных экологических факторов и изменением иммунной реактивности животных [3].

Вместе с тем в настоящее время во всем мире наблюдается совершенно объективный процесс — глобальный рост антибиотикорезистентности микроорганизмов к АМП. Проблема резистентности во многом обусловлена широким и часто нерациональным использованием данных препаратов [7].

Потенциальное клиническое значение антибиотикорезистентности было отмечено еще в 1945 году Александром Флемингом при произношении благодарственной речи во время получения им Нобелевской премии.

Действительно, наличие устойчивости бактерий к сульфамидным препаратам во время Второй мировой войны заставило врачей насторожиться в отношении последующей устойчивости к антибиотикам, и они оказались правы (Lesch, 2007). Если в конце 1940-х и 1950-х годов какие-либо бактерии и могли служить примером антибиотикорезистент-

ности, то это был *Staphylococcus aureus*, устойчивость к антибиотикам и роль во вспышках внутрибольничных инфекций которого выявила Мэри Барбер в Великобритании (Barber, 1947; Podolsky, 2015). Последствия были очевидны как для врачей-инфекционистов, так и для врачей общей практики. Как заявила британский терапевт Линдси Баттен перед Королевским медицинским обществом в 1954 году: «Эти смертоносные стафилококки... не пираты, это отряды армии. Они являются предзнаменованием... Мы должны изучить баланс природы в поле и на живой изгороди, в носу, горле и кишечнике, прежде чем серьезно его нарушить. Мы можем дойти до неэффективности антибиотиков, полностью исчерпать эффективные боеприпасы, и тогда бактерии и плесень будут господствовать» (Batten, 1955) [50].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), устойчивость бактерий, в основном возбудителей зоонозных болезней, к антибиотическим лекарственным средствам в настоящее время представляет одну из самых больших угроз человечеству. Экономические потери в животноводстве, связанные с распространением устойчивых к антибиотикам возбудителей болезней животных, составляют десятки миллиардов долларов в год. В глобальном масштабе, по данным ВОЗ, общее число случаев инфицирования человека устойчивыми патогенными микроорганизмами в мире неуклонно растёт [1, 13].

По данным отчета Межведомственной комиссии по антимикробной резистентности генеральному секретарю ООН в апреле 2019 г., в настоящее время по меньшей мере 700 000 человек умирают каждый год из-за лекарственно-устойчивых заболеваний, в том числе 230 000 человек — от туберкулеза, вызванного микобактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

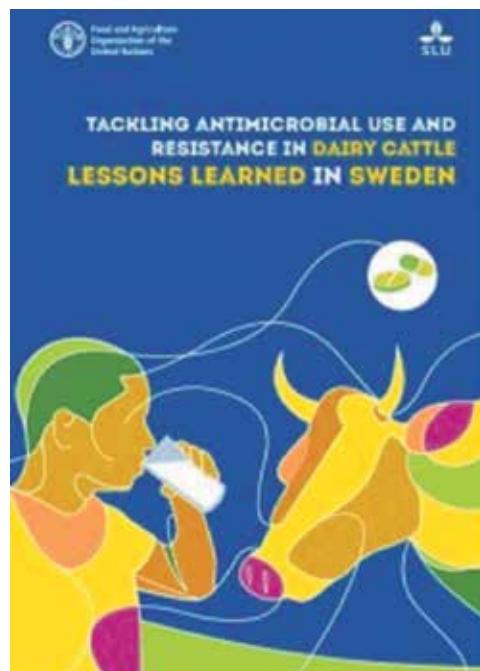
Ситуация усугубляется ещё и тем, что резистентные к противомикробным препаратам микроорганизмы распространены повсеместно и их выделяют от человека, животных, из пищевой продукции и различных объектов окружающей среды. Научные данные свидетельствуют о том, что устойчивость к антибиотикам возникает вследствие селективного воздействия antimикробных препаратов на различные структуры микробной клетки. Особую опасность представляет бесконтрольное, необоснованное применение антибиотических средств при выращивании продуктивных животных [51].

Важную роль в появлении и распространении резистентных бактерий играет активное использование антибиотиков в качестве стимуляторов роста при откорме животных, практикуемое со второй половины прошлого века и к настоящему времени ставшее неотъемлемой частью интенсивного животноводства во многих странах мира [13].

Две трети прогнозируемого прироста потребления ветеринарных препаратов в животноводстве объясняется увеличением количества продуктивных животных на планете, причем для трети из них используют интенсивные методы выращивания и откорма. В итоге, по прогнозу ВОЗ, уже к 2050 г. это может привести к дальнейшему распространению и увеличению числа резистентных к антибиотикам возбудителей болезней человека и гибели миллионов людей.

Большинство стран (Франция, Дания, Нидерланды, Германия, Бельгия, Испания, Китай, США и другие) строят свою стратегию antimикробной безопасности на том, что применение АМП в животноводстве является ключевым фактором появления резистентных микроорганизмов в хозяйствах, а ограничение ветеринарного применения антибиотиков приводит к снижению резистентности.

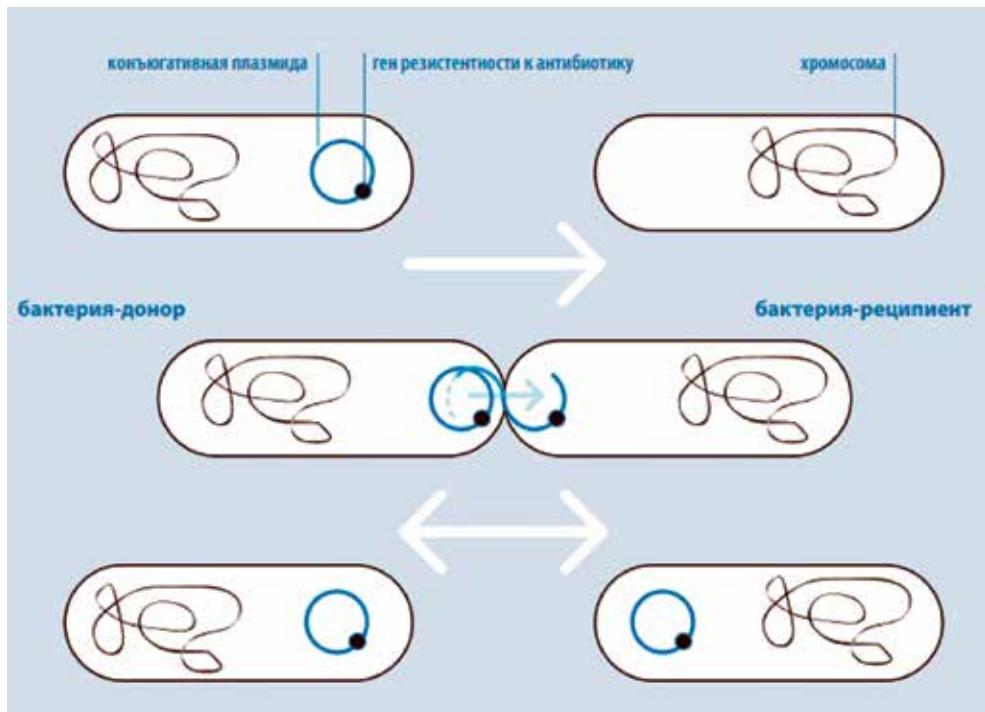
В Германии было показано, что резистентность в молочных стадах КРС, выращенных на «органических» фермах (где не применяют антибиотики), значительно ниже, чем на фермах традиционного типа. Так, если в первом случае (на органических фермах) наблюдалась устойчивость только к старым и широко распространённым антибиотикам, то во втором — к широкому спектру antimикробных средств [32].



Появляющиеся на фермах резистентные зоонозные микроорганизмы могут заражать человека тремя основными способами: через продукты питания, при контактах с животными (в группе риска ветеринары и животноводы) и через окружающую среду. Помимо прямого попадания резистентных бактерий с ферм в организм человека важным фактором передачи устойчивости является горизонтальный перенос генов, в котором гены могут быть фактически переданы между бактериями, в том числе между различными видами бактерий.

Имеющийся у многих бактерий фермент транспозаза может вырезать участок ДНК резистентной бактерии, содержащий ген устойчивости к антибиотику, и переместить вырезанный сегмент в плазмиду (внекромосомную самовоспроизводящуюся кольцевую молекулу ДНК). Затем плазмида, содержащая ген устойчивости к антибиотику, может передаваться другим бактериям.

резистентности была показана передача их патогенным микроорганизмам от комменсальных и свободно живущих бактерий. Основным механизмом переноса генетического материала является конъюгация. Кроме того, в последнее время появились сведения о том, что механизмы трансформации и трансдукции играют более существенную роль, чем считалось ранее [52].



Всё большее научных исследований говорит о том, что в этом процессе определенную роль играют не только гены устойчивости, обнаруживаемые у клинических патогенов, но и общая совокупность патогенных, комменсальных и свободно живущих бактерий, бактериофагов и мобильных генетических элементов. Все они являются резервуаром резистентности, так называемой «резистомой», из которой клинические патогены могут получать гены устойчивости путём горизонтального переноса. Для некоторых клинически значимых генов

Актуальность проблемы антибиотикорезистентности в ветеринарной сфере для нашей страны стоит на первом месте. Меры, связанные с контролем применения антибиотиков в животноводстве и ветеринарии разных стран, имеют много общего и включают:

- организацию мониторинга резистентных бактерий и использование антибиотиков в животноводстве;
- гармонизацию национальных методов определения чувствительности к антибиотикам с международными методами;

– координацию сотрудничества и совместных усилий на национальном, региональном и глобальном уровнях различных ведомств, вовлеченных в данную проблему;

– укрепление законодательной базы в отношении применения антибиотиков в животноводстве, правил регистрации ветеринарных антибиотиков и других;

– снижение уровня применения в ветеринарии антибиотиков, выраженное в конкретных численных значениях их целевых уровней (например, снизить общее использование на 20%);

– снижение уровня использования антибиотиков, в первую очередь критически важных для медицины, включая цефалоспорины 3–4-го поколений и фторхинолоны;

– издание руководств, инструкций и других информационных материалов по результатам мониторинга антибиотиков в ветеринарии, доступных не только специалистам, но и широким слоям населения.

Главным компонентом национальных программ является организация и проведение мониторинга распространения устойчивых к антибиотикам бактерий. Очевидно, что сбор и анализ данных мониторинга по выделению устойчивых бактерий из различных источников — человека, животных, объектов окружающей среды, продукции животного происхождения — трудно переоценить [44]. Без них невозможно представить объективную картину, связанную с устойчивыми бактериями, просчитать экономический ущерб, наносимый ими, риски распространения особо вирулентных штаммов для человека и животных, разработать и оценить эффективность научно-обоснованных программ по минимизации распространения устойчивых бактерий в первичных звеньях пищевой цепи.

В настоящее время программы мониторинга за распространением устойчивых бактерий проводятся в большинстве развитых стран [36, 38, 42].

Благодаря таким программам в настоящее время, по данным ежегодного отчета ЕМА, в Европе общие продажи антибактериальных препаратов упали более чем на 34% в период с 2011 по 2018 годы. 10-й ежегодный отчет о Европейском надзоре за потреблением ветеринарных противомикробных препаратов был составлен с использованием данных, представленных из 31 европейской страны (30 стран ЕС/ЕЭЗ и Швейцария) в Европейское агентство по лекарственным средствам на 2019 год. В своем официальном докладе Иво Клаассен, глава отдела ветеринарных лекарств ЕМА, отметил, что неуклонное снижение продаж ветеринарных антибиотиков в течение 10 лет показывает, что Европа находится на правильном пути в борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Рекомендации ЕС и национальные кампании, пропагандирующие разумное использование антибиотиков у животных, имеют положительный эффект. Значительная разница в группах продаж за 2018 год, выраженная в мг/PCU, наблюдалась между странами с наибольшим и наименьшим объемом продаж (от 2,9 до 466,3 мг/PCU). Из общего объема продаж противомикробных препаратов в 31 стране в 2018 году наиболее значительными были тетрациклины (30,7%), пенициллины (28,8%) и сульфаниламиды (8,4%), что в целом составило 67,9% от общего объема продаж в 31 стране. В частности, в период с 2011 по 2018 год продажи цефалоспоринов 3 и 4-го поколений снизились на 24,4%, полимиксинов — на 69,8%, фторхинолонов — на 4,2%, а продажи других хинолонов — на 74,4%.

В нашей стране необходимо разрабатывать национальную программу по мониторингу и контролю устойчивых к антибиотикам возбудителей болезней, гармонизированную с международными требованиями Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ). Организация и проведение мониторинга и контроля антибиотикорезистентности микробов, попавших в пищевую цепь, является одной из самых важных задач как ветеринарной, так и медицинской службы любой страны [20].

Современная наука считает, что подход к решению проблемы антибиотикорезистентности должен быть комплексный.

Первый вектор — снижение использования антибиотиков и утверждение программы борьбы с антибиотикорезистентностью в животноводстве путем рационального применения антибактериальных препаратов. Второй вектор — поиск альтернативных антибиотикам лекарственных средств для ветеринарного применения. Третий вектор — совершенствование системы фармаконадзора и системы оценки рисков применения антибактериальных препаратов. В прикладном понимании данного вопроса эти процессы должны быть взаимосвязаны.

Основное внимание должно быть уделено постоянному осуществлению профилактических мер для предупреждения заболеваний, чтобы тем самым снизить потребности в антибиотиках. Чтобы свести к минимуму количество инфекций у сельскохозяйственных животных и сократить объемы применения антибиотиков, необходимо прилагать усилия для улучшения состояния здоровья животных, благодаря чему удастся сократить профилактическое

и терапевтическое использование антибиотиков. Этого можно добиться, улучшая санитарно-гигиенические условия, обеспечивая биобезопасность и хорошее ведение фермерского хозяйства, а также предупреждая заболевания благодаря применению вакцин и других профилактических мер, например использованию пробиотиков, пребиотиков. При рациональном использовании всеобъемлющего комплекса мер по профилактике заболеваний можно добиться хорошего состояния здоровья животных и улучшить экономические показатели производства пищевых продуктов животного происхождения, не прибегая к антибиотикам, но используя их только для лечения больных животных [34, 35, 39, 47, 48].

В 2017 г. ВОЗ составила приоритетный список патогенных микроорганизмов для разработки новых антибиотиков, т.е. таких бактерий, для которых проблема антибиотикорезистентности стоит наиболее остро.

В списке три группы бактерий — со средним, высоким и критическим приоритетом, в него вошли и некоторые классические зоонозные микрорганизмы:

— в группу высокого приоритета — устойчивые к фторхинолонам кампилобактер и сальмонелла, устойчивые к ванкомицину энтерококки;

— в группу критического приоритета — кишечная палочка, устойчивая к карбапенемам и цефалоспоринам третьего поколения (антибиотикам из группы бета-лактамных), несущая гены бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL) [1].

В России в 2017 году была принята «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности до 2030 года», а в 2019-м утвержден план мероприятий по реали-

зации этой стратегии, рассчитанный до 2024 года. Документ предусматривает совершенствование госрегулирования в сфере применения противомикробных препаратов, разработку и актуализацию рекомендаций при инфекционных и паразитарных заболеваниях с учетом актуальных схем терапии, проведение мониторинга остаточного количества антибиотиков в продовольственном сырье и пищевых продуктах.

В нашей стране использование антибиотиков в качестве стимуляторов роста не допускается. В утвержденном в марте 2019 г. Плане мероприятий по реализации стратегии борьбы с антибиотикорезистентностью (Национальном плане) есть пункты о запрете и профилактическом их применения (останется только терапевтическое), рассматриваются меры по ограничению применения отдельных групп антибактериальных средств (в первую очередь особо важных для медицины), в том числе путем введения рецептурного отпуска.

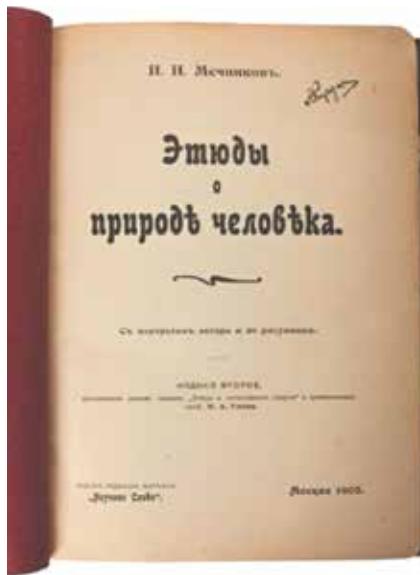
В Российской Федерации централизованная система мониторинга устойчивости изолятов, выделяемых от животных и из продуктов питания, со стороны Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору ( Россельхознадзора) пока отсутствует, однако такие работы активно проводятся.

Например, подведомственный Россельхознадзору Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ») исследовал антибиотикорезистентность листерий, выделенных из различных пищевых продуктов животного происхождения. В 2010–2015 гг. Всероссийский центр качества и стандартизации кормов и лекарственных средств для животных (ФГБУ «ВГНКИ») провел сравнение

антибиотикорезистентности изолятов сальмонелл из музейной коллекции (выделенных в период 1948–2009 гг.) и изолятов, выделенных в 2010–2012 гг. из пищевых продуктов, кормов и биоматериала для животных. Свежие изоляты продемонстрировали двукратное увеличение устойчивости к доксициклину и стрептомицину. В несколько раз возросла промежуточная устойчивость к норфлоксацину и ципрофлоксацину. Проводят мониторинг антибиотикорезистентности бактерий, выделяемых из продуктов питания, и Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Так, по данным ведомства за 2015 г., в популяциях штаммов сальмонелл, выделенных от людей, животных и из пищевых продуктов животного происхождения, отмечена резистентность, в том числе множественная, к клинически значимым антимикробным препаратам для лечения сальмонеллезов у людей (фторхинолонам и цефалоспоринам), обусловленная идентичными механизмами резистентности (продукцией бета-лактамаз и хромосомными мутациями). Устойчивость к одному и более классу антибиотиков отмечена у 76,2% штаммов сальмонелл, в основном среди сероваров *Salmonella typhimurium* и *S. infantis* [20, 21].

Безуспешные попытки контролировать проблему путём чередования схем применения антибиотиков и химиопрепаратов, их видов или доз не дают желаемого результата.

В условиях промышленного животноводства лечение болезни зависит от чувствительности микрофлоры к используемым антибиотикам, а также от состава симбиотической микрофлоры гастроинтестинального тракта животного.



Важное место в понимании роли микрофлоры имели наблюдения за животными, микробная экология которых была изменена под действием антибиотиков и других факторов. Безмикробные животные — одна из главных моделей для демонстрации важности микрофлоры и поддержания гомеостаза организма хозяина в естественных условиях обитания [2].

Илья Ильич Мечников в своей книге «Этюды о природе человека», написанной в 1905 году, отмечал, что французский патолог Шарль-Жозеф Бушар (1837–1915) обратил внимание на отравление организма, зависящее от нашего кишечного канала, то есть от кишечной микрофлоры: «Между этими микробами могут быть безвредные, даже такие, которые полезны, но, бесспорно, есть много таких, присутствие которых вредит здоровью и жизни. Флора эта очень разнообразна и заключает большое число видов, между которыми встречаются палочки, кокки и разные другие микробы; некоторые из них еще недостаточно изучены...».

Первые исследования по влиянию пробиотической флоры на организм животного были проведены профессором Максом Шотелиусом на цыплятах: «Цыплята вылуплялись из яиц и жили несколько недель; но, не заключая микробов внутри своего тела и питаясь одной стерилизованной пищей, они, вместо того, чтобы прибавляться в весе, худели и впадали в крайний маразм». Когда Шотелиус прибавлял бактерии к пище этих каектических цыплят, последние немедленно поправлялись и возвращались к нормальному состоянию. Аналогичный опыт был сделан гжою Мечниковой (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1901, p. 306) над головастиками лягушки: выкормленные в сосуде с хлебом, заключающим микробы, они развивались нормально; когда же выращивание производилось при полном отсутствии микробов, то головастики хотя и жили в течение месяцев, но были каектическими и останавливались в своем развитии [12].



В своих трудах доктор Макс Шотелиус приводил много примеров, указывающих на пользу, приносимую некоторыми видами дробянок.



Дробянки (лат. *Monera*) — упразднённое ныне царство живых организмов, которое включало в себя одноклеточные безъядерные организмы (прокариоты), такие как бактерии.

Таксон *Monera* был впервые предложен в ранге типа Эрнстом Геккелем в 1866 году; в дальнейшем таксон был повышен до ранга царства в 1925 году Эдуаром Шатоном (фр. Édouard Chatton), получив общее признание. Последней общепринятой классификацией живых организмов с таксоном *Monera* была пятицарственная система классификации, введённая Робертом Уиттекером в 1969 году. По трёхдоменной системе, созданной в 1990 году и отражающей эволюционную историю

жизни так, как её в настоящее время понимают, организмы, относившиеся к царству *Monera*, были разделены на два домена: археи и бактерии (третим доменом являются эукариоты). С этого времени таксон *Monera* не употребляется. Термин «дробянки» является неофициальным названием членов этой группы и до сих пор иногда используется (как и термин «прокариота») для обозначения отдельного представителя или всего домена.

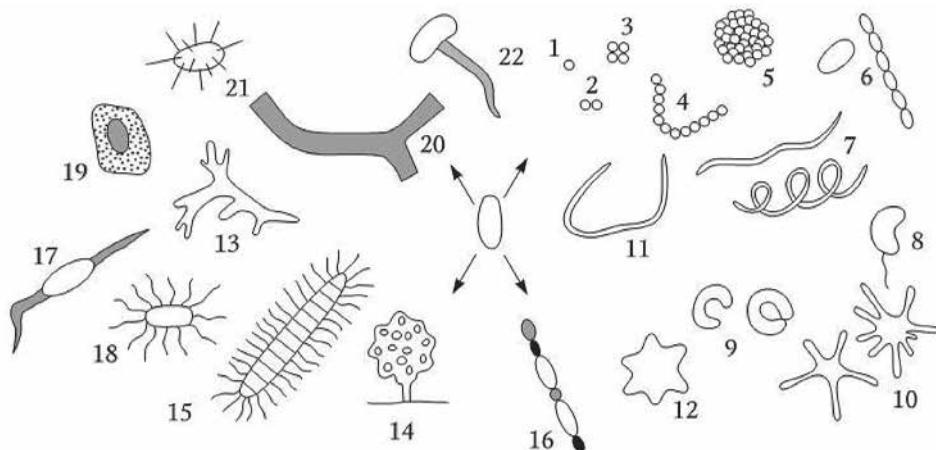


Макс Шотелиус писал, что экспериментальное решение вопроса о пользе и вреде дробянок для питания теплокровных животных и человека встречало немало технических трудностей, но удалось доказать значение кишечных бактерий для питания животных посредством экспериментов [28].

Открытие о многочисленных и разнообразных ассоциациях микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт, принадлежит нашему соотечественнику И.И. Мечникову, который предположил, что основными причинами старения является размножение

#### Действующая классификация бактерий по Д.Х. Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1985)

Домен « <i>Bacteria</i> » (эубактерии)	Домен « <i>Archaea</i> » (архебактерии)
Бактерии с тонкой клеточной стенкой — грамотрицательные* Бактерии с толстой клеточной стенкой — грамположительные Бактерии без клеточной стенки (класс <i>Mollicutes</i> — микоплазмы)	Архебактерии не содержат пептидогликан в клеточной стенке. Имеют особые рибосомы и рибосомные РНК (рРНК). Термин «архебактерии» появился в 1977 г. Это одна из древних форм жизни, что и означает приставка «архе». Среди них нет возбудителей инфекционных болезней



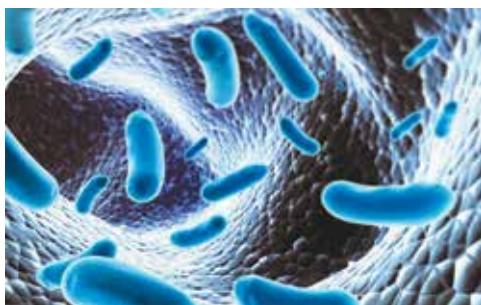
**Разнообразие форм прокариот:** 1 — кокк; 2 — диплококк; 3 — сарцина; 4 — стрептококк; 5 — колония сферической формы; 6 — палочковидные бактерии (одиночная клетка и цепочка клеток); 7 — спириллы; 8 — вибрион; 9 — бактерии, имеющие форму замкнутого или незамкнутого кольца; 10 — бактерии, образующие выросты; 11 — бактерия червеобразной формы; 12 — бактериальная клетка в форме шестиугольной звезды; 13 — представитель актиномицетов; 14 — плодовое тело миксобактерии; 15 — нитчатая бактерия рода *Caryophanon* с латерально расположенными жгутиками; 16 — нитчатая цианобактерия, образующая споры (акинеты) и гетероцисты; 8, 15, 17, 18 — бактерии с разными типами жгутикования; 19 — бактерии, образующие капсулу; 20 — нитчатые бактерии группы *Sphaerotilus*, заключенные в чехол, инкрустированный гидратом окиси железа; 21 — бактерия, образующая шипы; 22 — *Galionella*

вредной микрофлоры в кишечнике и хроническое отравление организма продуктами гниения. Он предположил, что «кишечная аUTOинтоксикация» и возникающие вследствие ее вещества могут быть продавлены с помощью модификации кишечных бактерий и замены протеолитических микробов, таких как клоstrидиум, производящих токсические вещества (включая фенолы, индолы и аммиак после переваривания белков), на полезные микроорганизмы.

Нормофлора кишечника выполняет многочисленные взаимосвязанные функции по поддержанию гомеостаза организма, наряду с его другими органами и системами. Одна из основных функций кишечной нормофлоры — барьерная, в первую очередь — защита от посторонней флоры, попадающей в гастроинтенстинальный тракт. Эту функцию обеспечивают несколько механизмов:

- активизация синтеза антител в слизистой оболочке кишечника;
- выработка веществ, подавляющих условно-патогенную и патогенную микрофлору;
- блокировка адгезии посторонней микрофлорой на слизистой оболочке толстой кишки;
- конкурентные отношения в захвате питательных веществ.

В частности, бифидобактерии, производя в процессе своей жизнеде-



ятельности органические кислоты, создают кислую среду в кишечнике, что препятствует размножению патогенной флоры и способствует лучшему всасыванию витамина D, кальция, железа, а также поддерживает нормальную моторику кишечника. Лактобактерии в процессе сбраживания углеводов образуют вещества с антибиотической активностью (лизоцим, ацидофилин и др.), эшерихии — колицины, тормозящие рост энтеропатогенных кишечных палочек и т.д. Кишечная нормофлора участвует также в инактивации биологически активных участников метаболизма, исполнивших свою функцию, в частности ферментов, выделяющихся с пищеварительными соками. Метаболиты нормофлоры, например масляная кислота, предотвращают транслокацию бактерий из просвета кишки во внутреннюю среду организма.

Важная роль нормофлоры — метаболическая. Она состоит в следующем:

- ферментативной переработке микробами некоторых пищевых веществ (симбионтное пищеварение), например «неперевариваемой» клетчатки (целлюлозы), до простейших углеводов, которые всасываются и дают макроорганизму около 5% энергии;

- способствовании выработке ряда ферментов, участвующих в обмене белков, жиров, углеводов, холестерина, желчных кислот и др.;

- обеспечении существенной части витаминных потребностей организма: синтез витаминов группы В и витамина K (лидирующая роль принадлежит кишечной палочке, которая образует 9 витаминов);

- продуцировании ряда биологически активных веществ, гормонов (эстрогенов), мочевой кислоты, нейропептидов, незаменимых аминокислот, а также множества соединений, являющихся эффекторами, кофакторами и/или сиг-

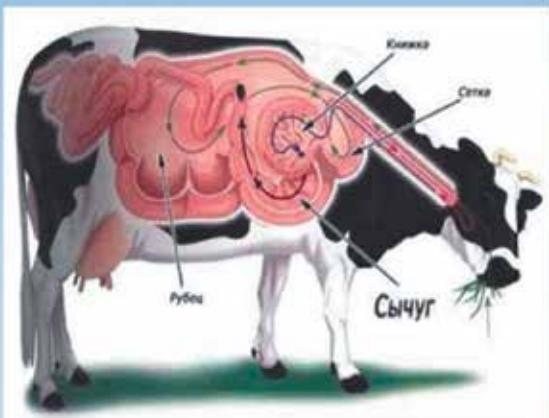
нальными молекулами, регулирующими разнообразные физиологические функции, метаболизм и поведенческие реакции. Среди подобных соединений — короткоцепочечные жирные кислоты, играющие важную энергетическую и регуляторную роль в здоровом организме, а также участвующие в патофизиологии ряда заболеваний не только гастроинтестинального тракта, но и других органов и систем. 95% короткоцепочных жирных кислот быстро всасываются апикальной мембраной колоноцитов и в их митохондриях подвергаются окислению (главным образом масляная кислота) с образованием универсального источника энергии — АТФ. Значительная их часть (преимущественно уксусная и пропионовая) по воротной системе достигают печени, где метаболизируются до глюкозы.

Глобальной функцией нормофлоры является участие в формировании иммунобиологической реактивности макроорганизма. Лимфоидная ткань кишечника — самое большое лимфоидное образование организма, выполняющее все функции этой ткани (около 60% иммунных клеток организма находятся в его слизистой оболочке). Эпителий пейеровых бляшек специализирован на захвате и отборе антигенов для возбуждения адаптивного иммунного ответа. Иммунная система контролирует ответы на белки, получаемые с пищей, на патогенные микроорганизмы — вирусы (ротавирус, полиомиевирус и др.), бактерии (*Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium* и т.д.), паразиты (*Toxoplasma*). Облигатная микрофлора кишечника способствует синтезу иммуноглобулинов M, A и G, стимулирует созревание лимфоидного аппарата, участвует в продукции интерферонов, лизоцима, веществ противоопухолевой защиты, регулирует баланс между про- и противовоспалительными цитокинами.



Кишечник крупного рогатого скота с правой стороны (частично схематизировано) :

- 1 – сырт;
- 2 – двенадцатиперстная кишка;
- 8 – тощая кишка;
- 9 – подвздошная кишка;
- 10 – слепая кишка;
- 11 – 22 - части ободочной кишки;
- 23 – прямая кишка;
- 24 – подвздошнослепая связка;
- 25 – брыжейка тощей кишки;
- 26 – 29 брыжеечные лимфоузлы.



Нормофлора кишечника синтезирует также ряд биологически активных веществ, способствующих разрушению аллергенов, нейтрализации экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов. Так, лактобактерии стимулируют фагоцитарную активность нейтрофилов, макрофагов, синтез иммуноглобулинов и образование интерферонов, интерлейкина-1. Бифидобактерии регулируют функции гуморального и клеточного иммунитета, препятствуют разрушению секреторного иммуноглобулина А (белка, который участвует в обеспечении местного иммунитета и является важнейшим маркером иммунного ответа), стимулируют интерферонообразование, вырабатывают лизоцим, который угнетает размножение и рост патогенных бактерий. Нормофлора толстой кишки способствует регенерации ее слизистой оболочки и

процессам дифференцировки клеточных структур. Таким образом, состояние кишечной микробиоты — определяющий фактор функционирования иммунной защиты организма в целом.

Немаловажной и значимой функцией можно назвать регуляторную функцию, при которой микробиота кишечника участвует в регуляции водно-солевого обмена, в рециркуляции желчных кислот, холестерина, оксалатов и других биомолекул. Холестерин-модифицирующая активность нормофлоры, в частности лактобацилл, обусловливает антиатеросклеротический эффект. Медиаторы, синтезируемые нормофлорой, участвуют в регуляции газового состава кишечника и других полостей организма, физиологической активности гастроинтестинального тракта, моторики толстой кишки и времени транзита кишечного содержимого, объема,

консистенции и частоты дефекации, висцеральной чувствительности, а также влияют на работу сердечно-сосудистой, кроветворной, иммунной и других систем организма.



Дезинтоксикационная функция микробиоты кишечника: в результате биохимической активности микрофлоры происходит биотрансформация ксенобиотиков (чужеродных веществ) в нетоксические продукты и их выведение из организма. Микробные клетки способны аккумулировать (как биоэнтегросорбент) значительные количества различных токсических продуктов, включая тяжелые металлы, фенолы, формальдегиды, яды растительного, животного, микробного и искусственного происхождения и другие ксенобиотики, с последующим выведением их из организма естественным путем. Детоксикация канцерогенов, мутагенов и других онкогенов обуславливает противоопухолевую активность нормальной микрофлоры.

Таким образом, кишечный микробиоценоз рассматривается как своеобразный экстракорпоральный орган или система, по своей значимости сопоставимый с другими системами макроорганизма животного.

Для обозначения патологического состояния, характеризующегося измене-

нием качественного и/или количественного состава нормальной кишечной микробиоты, а также метаболическими и иммунными нарушениями, во второй половине XX века во врачебную практику был введен термин «дисбактериоз кишечника». Позже был предложен более широкий термин — «дисбиоз кишечника» (от лат. *dys* — ‘нарушение, расстройство’, *bios* — ‘жизнь’), обозначающий нарушение функционирования и механизмов взаимодействия макроорганизма, его микрофлоры. Дисбиоз кишечника всегда рассматривался не как самостоятельная нозологическая форма, а как симптомокомплекс, подразумевающий уменьшение общего количества нормальной резидентной микрофлоры с замещением ее видами, которые в норме присутствуют в минимальном количестве или отсутствуют вовсе [22].



Желудочно-кишечный тракт взрослого животного содержит более 1000 видов бактерий, взаимодействующих как друг с другом, так и с организмом хозяина. Однако гастроинтестинальный тракт жвачных имеет принципиальные отличия ввиду того, что основное и симбионтное пищеварение происходит в одном из отделов желудка — рубце. Рубец является основным резервуаром микроорганизмов (10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> КОЕ в 1 мл содержимого рубца). В рубце переваривается до 90% общего сухого корма и до 70% целлюлозы.

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Other</i> spp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus francium</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. essensis</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. laterosporus</i>	
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. lactis</i>		
<i>L. sporogenes</i>		

Известно, что у родившихся телят преджелудки первые 1–2 недели не работают, но хорошо развит съчуг, он в два раза больше рубца с сеткой. По пищеварительному желобу молозиво поступает в съчуг, минуя рубец. Но в съчужном соке теленка, который в первые дни после рождения выделяется в небольшом количестве, не содержится свободной кислоты, и ферментативная активность его очень низкая. Защитные свойства в организме телят начинают вырабатываться спустя две недели. При своевременном получении новорожденным теленком молозива усиливается колонизация тонкого отдела кишечника лакто- и бифидобактериями [21].

Первыми микроорганизмами, заселяющими рубец, являются стрептококки и бактерии группы кишечной палочки, бактерии рода *Lactobacillus* в рубце составляют к концу первой недели  $10^8$  КОЕ и держатся в такой концентрации до 3-й недели жизни, а затем их содержание уменьшается. Содержание *Bifidobacterium* в течение первых месяцев жизни телят, когда основной их рацион составляет материнское молоко, составляет 60–95% от частоты встречаемости всех иных видов микроорганизмов.

С переходом на другие виды кормов, в том числе на растительный корм,

процент молочнокислых бактерий снижается до 60–25% и они уступают место споровым микроорганизмам, разлагающим клетчатку и являющимся естественными обитателями почвы и травы.

Основными видами молочнокислых бактерий, выделяющихся из рубца коров, являются *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*.

Кроме того, из рубца жвачных выделяются бифидобактерии, которые способны использовать азот аммиака в качестве единственного источника азота. Так, из бычьего рубца были выделены азототolerантные *Bifidobacterium globosum* и *Bifidobacterium ruminale* — потенциально гетероферментативные бактерии.

В рубце, благодаря активности микрофлоры, происходят различные ферментативные процессы, от которых зависят не только пищеварение, но и интрамедиальные изменения в организме, что в значительной мере влияет на степень воспроизведения и качество продукции животного происхождения. Микробиота рубца также способствует переработке корма малой питательности в белки с богатым качественным составом (незаменимые аминокислоты), в углеводные соединения, богатые энергией, и витамины (группы В, К).

### Микрофлора рубца взрослых особей крупного рогатого скота

№	Род и вид	Морфология	Отношение к $O_2$	Субстрат содержимого рубца	Конечный продукт
1	Bacteroides succinigenes	Грам+ палочка	анаэроб	целлюлоза	уксусная и янтарная кислота
2	Bactrodes amilophilus	Грам— палочка	анаэроб	крахмал	муравьиная и янтарная кислота
3	Butirivibrio fibrisolven	Грам— палочка	анаэроб	целлюлоза	муравьиная и молочная кислота, $CO_2$ , $H_2$
4	Clostridium locchaedii	Грам+ палочка	анаэроб	целлюлоза	муравьиная и уксусная кислота
5	Ruminococcus flavefaeciens	Грам— кокк	анаэроб	целлюлоза	муравьиная и уксусная кислота
6	Ruminococcus parvum	Грам— кокк	анаэроб	целлюлоза	уксусная и пропионовая кислота
7	Streptococcus bovis	Грам+ кокк	факультативный анаэроб	крахмал, растворимые сахара	молочная кислота
8	Succinovibrio dextrinosolvent	Грам+ палочка	анаэроб	крахмал	уксусная и янтарная кислота
9	Lactobacillus sp.	Грам+ палочка	анаэроб	крахмал, растворимые сахара	молочная кислота
10	Propionibacterium acnes	Грам+ палочка	факультативный анаэроб	молочная кислота	уксусная и пропионовая кислота, $CO_2$
11	Veillionella alcalescens	Грам— кокк	анаэроб	молочная, янтарная кислота	уксусная и пропионовая кислота, $CO_2$
12	Peptostreptococcus elsdena	Грам+ кокк	анаэроб	молочная кислота	уксусная, пропионовая, валерьяновая, капроновая кислота, $CO_2$ , $H_2$

Особое значение для молодых животных имеет качественное и количественное соотношение молочнокислых бактерий, которые составляют до 60% микробиоты рубца и способствуютному перевариванию белков молока и последующему оптимальному заселению

рубца микрофлорой, свойственной для взрослого животного [10].

Факторами, индуцирующими изменения кишечной микробиоты, как правило, являются: санитарное состояние ферм, стресс, нерациональная антибиотикотерапия. При нерациональном

#### «ЗА» и «ПРОТИВ» в использовании пробиотических и антибиотических препаратов

Показатели	Пробиотики	Антибиотики
Резидентность в организме	да	нет
Риск возникновения бактериальной резистентности	нет	да
Качество мяса и молока	да	нет
Конверсия корма	да	нет
Предубийная выдержка	нет	да
Пролонгированная персистенция условно-патогенных и патогенных микроорганизмов	нет	да
Термолабильность	да	нет
Использование у стельных особей	да	нет
Использование в период лактации	да	нет
Использование у телят до отъема	да	нет

использовании антибиотиков наблюдается изменение кишечной микробиоты за счет селекции популяции бактерий, которые нечувствительны к большинству антибиотиков, и в случае, если антибиотикотерапия проходит эффективно с признаками выздоровления животного, то обязательно присутствует фактор нарушения соотношений индигенной микрофлоры, что препятствует полному выздоровлению животного. В литературе приводятся данные, что антибиотикотерапия влияет на колонизационную резистентность лактобацилл и, как следствие, их возможную элиминацию.

С уходом от применения антибиотиков на субтерапевтическом уровне одним из средств неспецифической профилактики и коррекции желудочно-кишечных и гепатобилиарных патологий являются пробиотики.

Пробиотики как средство неспецифической профилактики желудочно-кишечных болезней молодняка находят признание во всех странах мира с развитым животноводством. Во многих странах мира ученые рекомендуют использование пробиотиков для коррекции кишечного биоценоза начиная с первых часов жизни животного [20, 26].

Для борьбы с кишечными дисбиозами русский ученый Илья Ильич Мечников первым предложил простое решение — пополнять численность хорошей микрофлоры извне с помощью кисломолочных продуктов, в которых бифидобактерии и лактобактерии находятся в относительно большом количестве, разработав диету с добавлением молока, ферментированного бактерией, которую он назвал «болгарской палочкой». Идеи Мечникова определили направление борьбы с кишечными дисбиозами на протяжении всего XX века.

В 1917 году германский профессор Альфред Ниссле изолировал непатогенный штамм кишечной палочки из фе-

калий солдата Первой мировой войны, который не вызывал развития энтероколита во время тяжелой эпидемии шигеллеза. Штамм кишечной палочки Ниссле 1917 — один из пробиотиков.

Первые бифидобактерии (*Bacillus bifidus communis*) были изолированы профессором института Луи Пастера Анри Тиссье от новорожденного, получавшего грудное кормление. В Японии доктор Минору Широта изолировал штамм *Shirota Lactobacillus casei* для борьбы со вспышками диареи. Продукт с этим штаммом выпускается с 1935 года.

Дефиниция «пробиотики» впервые была введена в 1965 г. Лилли и Стиллуэллом в противоположность антибиотикам: пробиотики были описаны как микробные факторы, стимулирующие рост других микроорганизмов. В 1981 году Torben Riise опубликовал обзор, в котором предложил под названием «пробиотик» понимать увеличение полезных микроорганизмов в пищеварительном тракте животного-хозяина путем введения больших количеств желательных бактерий. В 1989 г. Рой Фуллер сформулировал понятие «пробиотик» как живая микробная кормовая добавка, которая оказывает полезное действие на животного-хозяина путем улучшения его кишечного микробного баланса [37]. Это определение пробиотиков укоренилось в научной литературе и не претерпело до сегодняшнего дня никаких изменений.

Пробиотики — это важнейшие товары на мировом рынке, объем от продаж которых оценивается в миллиарды долларов в год. Они представляют собой кормовую добавку на основе живых микроорганизмов, которая улучшает баланс кишечной микробиоты, обменные и иммунные процессы.

Пробиотики также используют и в ветеринарии для микробной коррекции кишечной микробиоты после антибиотико- и химиотерапии для стимуляции

неспецифического иммунитета. Пробиотические микроорганизмы после попадания в организм выделяют биологически активные вещества, оказывающие прямое действие на патогенные микроорганизмы, а также опосредованное; это проявляется в активации специфических и неспецифических систем защиты микроорганизма. Применение пробиотиков в кормлении животных повышает продуктивность на 15–20%, эффективность лечения гастроинтестинальных болезней — на 30–40% и сокращает заболеваемость молодняка на 20–30%.

Доктор Фумияки и соавторы описывают в своих работах, что эффект применения *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium* на телятах вызывал увеличение суточного прироста массы тела, улучшение коэффициента конверсии и снижение дисбиозов [45].

Для телят пробиотические препараты играют огромную роль, так как именно этот вид сельскохозяйственных животных больше всех подвергается транспортным стрессам, смене корма и ветеринарным обработкам.

Микроорганизмы, используемые для получения пробиотиков для жвачных животных, должны соответствовать следующим требованиям:

- являться резидентными обитателями индигенной микрофлоры здоровых животных и обладать антимикробной активностью;
- являться метаболически активными в экосистеме рубца;
- обладать адгезивной активностью;
- быть стабильными и способными длительное время оставаться жизнеспособными при хранении в производственных условиях.

Антимикробная активность пробиотических микроорганизмов, в частности молочнокислых бактерий, связана

с выработкой органических кислот низкомолекулярных антибактериальных субстанций, бактериоцинов и ингибиторов протеинов, низкомолекулярных антибиотиков.

Наряду с молочной и уксусной кислотой лактобациллы могут вырабатывать небольшое количество муравьиной и сукциновой кислот, антибактериальное действие которых давно изучено.

К низкомолекулярным антибактериальным субстанциям, вырабатывающим лактобациллами, можно отнести перекись водорода, чья антимикробная активность известна. Предполагается, что лактобациллы, обладающие пероксидазной активностью, могут активировать пероксидазную систему в гастроинтестинальном тракте жвачных. Другим ингибиторным соединением, вырабатываемым лактобациллами, является диацетил, чья антибактериальная активность в отношении широкого спектра условно-патогенных микроорганизмов доказана многочисленными исследованиями [43].

Выработка бактериоцинов и низкомолекулярных антибиотиков отмечена у многих разновидностей молочнокислых бактерий. Бактериоцины лактобацилл обладают широким спектром активности на грамотрицательные микроорганизмы. Из культур ацидофильных лактобактерий выделен антибиотикоподобный ингибитор с низкой молекулярной массой — ацидолин, угнетающий микобактерии.

Бифидобактерии также обладают большой антагонистической активностью по отношению к условно-патогенной микрофлоре, некоторые штаммы вырабатывают лизоцим.

Исследования Kullisaar et al. (2002), Lin и Yen (1999), Mikesaar и Zilmer (2009) доказали антиоксидантную ак-

тивность молочнокислых бактерий, и интенсивность активности варьирует в зависимости от исследуемой культуры. В исследованиях T. Virtanen (2007) показано, что антиоксидантная активность бифидобактерий превосходит таковую лактобацилл. Исходя из этого, при использовании пробиотиков следует применять консорциумы пробиотических микроорганизмов. Так, при исследовании пробиотического консорциума лактобацилл, термофильных стрептококков и бифидобактерий была установлена их высокая антиоксидантная активность.

СОД, каталаза и ферменты глутатион-редокс-цикла составляют основу антиоксидантной ферментативной системы. Одним из механизмов инактивации радикалов антиоксидантного стресса является экспрессия СОД.

СОД — основной ингибитор образования токсичного супероксидного аниона, катализирующего реакцию дисмутации супероксидантов в перекись водорода.

В качестве компонента антиоксидантной системы в консорциуме выступает водорастворимый низкомолекулярный трипептид — глутатион. Именно он может принимать участие в детоксикации и защищать от прямого влияния перекиси водорода, повреждающего действия гидроксильных радикалов.

Кроме того, лакто- и бифидобактерии играют существенную роль в нейтрализации токсинов, вырабатываемых патогенными бактериями, а также некоторые из них способны деконъюгировать желчные кислоты, тем самым сдерживать рост условно-патогенных микроорганизмов.

В исследованиях Anthony J. показано, что лактобациллы и бифидобактерии обладают антигенотоксическим потенциалом и могут иметь

защитный эффект против атипичных клеток кишечника на ранних стадиях онкологии. В ряде работ также продемонстрировано ДНК-протекторное действие молочнокислых и бифидобактерий [30, 46].

Еще одним немаловажным фактором является возможность молочнокислых бактерий влиять на концентрацию метаболитов условно-патогенных микроорганизмов или на их энзиматическую активность. Так, например, активность нитрогенредуктазы, азоторедуктазы и  $\beta$ -глюкоронидазы к кишечнику лабораторных животных может быть снижена введением *Lactobacillus acidophilus* [35].

В настоящее время востребованы комбинированные пробиотические препараты. При этом сорбированная форма пробиотиков является пробиотиком последнего поколения. Она содержит в себе бактерии, которые иммобилизированы на частицах твердого сорбента, то есть частицах угля, цеолита и кремнезита или кремнезема. Биологическая активность таких препаратов высока и основана на более стабильной сохранности и адгезивной активности иммобилизованных микроорганизмов, а сорбенты, в свою очередь, быстрее и эффективнее снимают интоксикацию и ускоряют reparативный процесс [24].

Разработка новых пробиотических препаратов для кормления животных является одним из перспективных направлений микробных биотехнологий. Переработка малоценных отходов перерабатывающих производств при помощи биотехнологических методов за счёт микробной биоконверсии с применением в качестве продуцентов пробиотических микроорганизмов позволяет получать наиболее ценные кормовые продукты с повышенным содержанием белка, биологически активные соединения и живые клетки пробиотических

культур, а также создает возможность разработки функциональных кормовых добавок и кормов нового поколения, которые, в свою очередь, обладают высокой кормовой ценностью и пробиотическими свойствами [31].

Еще Т.Р. и Lyons R.J. Fallon назвали наше время «наступающей эпохой пробиотиков». Одним из перспективных направлений разработки новых биопрепаратов является создание пробиотиков на основе микроорганизмов с заданными свойствами [25].

Последние исследования в нутрициологии позволили углубить понимание того, как можно поддерживать здоровье организма с помощью функциональных продуктов [6].

С помощью методов геномики и протеомики выяснено, что штаммы пробионты могут радикально влиять на экспрессию генов как других бактериальных штаммов кишечника, так и самих клеток кишечного эпителия, включая и выключая сотни генов, имеющих отношение к реализации иммунного ответа и метаболических реакций. В частности, выяснено, что в зависимости от штамма пробиотика или от их консорциума начинают вырабатываться различные интерлейкины, что регулируется сигнальными белками эпителиальных клеток, которые первыми оповещают иммунную систему о вторжении патогена.

Пробиотики — это продукты, используемые в животноводстве, формирующие индигенную микрофлору животных. Для жвачных это определение должно быть расширено ввиду того, что основным для этих видов животных является баланс рубца, в котором и происходит основное пищеварение.

При этом профилактика нарушений пищеварения у жвачных и коррекция кишечной микрофлоры должны проходить по следующей схеме.



Осознание зависимости здоровья человека и животного от кишечного микробиоценоза дало толчок к разработке новых подходов к изучению и конструированию пробиотиков на молекулярном уровне, использованию в качестве экспериментальных моделей перевиваемых культур интестинальных клеток.

Всеми этими достижениями отечественная наука обязана российским ученым, внесшим существенный вклад в развитие направления пробиотиков, — Антипову В.А., Панину А.Н., Интизарову М.М., Ленцнеру А.А., Малик Н.И., Мазулович Т.В., Банниковой Л.А., Ноздрину Г.А. и др.

Первый жидкий отечественный пробиотик был разработан в 1953 году и представлял собой монокульттуру *Lactobacillus acidophilus*, в 1954 году был разработан жидкий пробиотический препарат ПАБК, в 1961 году в ветеринарную практику был внедрен препарат «Закваска жидкая комбинированная Саратовская-3».

Направление пробиотиков активно развивалось под руководством доктора ветеринарных наук, профессора А.Н. Панина на базе ВГНКИ ветпрепаратов.

В эпоху 90-х отечественными учеными были разработаны препараты Про-

биоцид, Аципол, АБС, Ацидофилин, Бифидумбактерин, однако широкого применения в ветеринарии они не нашли. Со временем стали появляться научные разработки, где в основе действующего вещества пробиотического препарата были микроорганизмы, не являющиеся привычными молочнокислыми бактериями, — это микроорганизмы рода *Bacillus subtilis*.

В сотрудничестве с различными научными коллективами сотрудниками лаборатории пробиотических и биологически активных препаратов ФГБУ «ВГНКИ» внедрены в ветеринарную практику пробиотические препараты Стрептобифид, Стрептобифид-форте, Интестевит, Лактицид, Бифидумбактерин сухой и жидкий, Фагосан, Реалак [17].



В настоящее время в Российской Федерации официального перечня микроорганизмов, разрешенных для использования в составе пробиотиков, нет, тогда как в США и в Европе он существует [18]. За последние 30 лет в стране зарегистрировано более 30 наименований пробиотических препаратов отечественного производства.

В настоящее время на отечественном рынке неизвестны пробиотические препараты, содержащие в своем составе бактероиды, лейконостоки, и

крайне ограничен состав стрептококковых препаратов.

Предпочтительным критерием использования пробиотических продуктов является его использование в ситуации, где их эффект очевиден, особенно при неоптимальных условиях содержания животных. Наиболее привлекательно то, что пробиотические кормовые добавки зачастую дешевле своих лекарственных аналогов. Так как применение пробиотических продуктов, как правило, занимает довольно длительное время ввиду того, что требуется коррекция микробиоты кишечника и заселение ее штаммами, в условиях животноводства стараются использовать лекарственные препаративные формы пробиотиков для более быстрого восстановления индигенной микрофлоры, что делает биотехнологические и лечебные мероприятия довольно затратными. Однако до настоящего времени так и не изучено, какое минимальное количество пробиотика необходимо дать для достижения эффекта колонизации кишечника нормофлорой, и поэтому в корм животнымдается заведомо большее количество препарата в соответствии с инструкцией по применению. Как только будут установлены пределы достаточности, цена на пробиотические препараты может измениться.

Вместе с тем в отечественном животноводстве по-прежнему используют большое количество пробиотических кормовых добавок, которые не хуже своих лекарственных аналогов справляются с вопросами нормализации микробиоты кишечника жвачных, а также выступают как факторы, значительно улучшающие гастро-билиарную рециркуляцию, конверсию корма и качественные показатели молока и мяса.

№№	Наименование препарата	Компонентный состав штаммов микроорганизмов
1	АБК	<i>L. acidophilus</i>
2	Активин	<i>P. shermanii</i>
3	Биосан	<i>L. delbrueckii, L. Buchneri</i>
4	Бифидумбактерин ветеринарный	<i>Bif. globosum</i>
5	Бифинорм	<i>Bif. adolescentis</i>
6	Биопротектин	<i>Bif. bifidum, L. acodophilus</i>
7	Бифидум СХЖ	<i>Bif. bifidum</i>
8	Бифитрилак	<i>Bif. bifidum, L. bulgaricus, L. fermentum, L. acidophilus</i>
9	Препараты группы «Ветом» (Ветом 1, 2, 3, 4, 5)	<i>Bac. subtilis</i>
10	Ветосубалин	<i>Bac. subtilis</i>
11	Галлиферм	<i>L. acidophilus</i>
12	Закваска Леснова	Целлюлозолитические микроорганизмы рубца лося
13	Зоонорм	<i>Bif. bifidum</i>
14	Интестевит	<i>Bac. ssp., Bif. globosum, Str. faecium</i>
15	Лаком	<i>L. acidophilus, P. shermanii, Str. faecium</i>
16	Лактоамиловарин	<i>L. amilovorus</i>
17	Лактобактерин	<i>L. plantarum, L. fermentum</i>
18	Лактоферон	<i>L. acodophilus, Str. faecium</i>
19	Лактобифадол	<i>Bif. bifidum, L. acodophilus</i>
20	ПАБК	<i>L. acidophilus, P. shermanii</i>
21	Ромакол	<i>E. coli M-17</i>
22	Саратовская-3	<i>Saccaramyces cerevisiae, L. buchneri</i>
23	Споровит	<i>Bac. subtilis</i>
24	Стрептобифид	<i>Bif. globosum, Str. faecium</i>
25	Споробактерин	<i>Bac. subtilis, Bac. licheniformis</i>
26	Стрептоэкколакт	<i>Str. lactis</i>
27	СТФ-1/56	<i>Str. faecium 1/56</i>
28	Субтилис Ж	<i>Bac. subtilis, Bac. licheniformis</i>
29	Субтилис С	<i>Bac. subtilis, Bac. licheniformis</i>
30	Фагосан	<i>L. acodophilus, Str. faecium</i>
31	Фитобактерин	<i>Ruminococcus albus</i>
32	Целлобактерин	<i>Ruminococcus albus</i>

## Литература

1. ВОЗ. Борьба с устойчивостью к антибиотикам с позиций безопасности пищевых продуктов в Европе. WHO Library Cataloguing in Publication Data Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. 2011.

2. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Микрофлора человека и животных и ее функции. М.: Гранть. 1998; 1: 65.

3. Бойко Т.В., Герунова Л.К. Анализ ассортимента химиотерапевтических средств, применяемых в молочном животноводстве. Вестник НГАУ. 2016; 91–96.

4. Глотов А.Г. и соавт., 2005; О.Г. Петрова и соавт., 2005; Е.В. Батищева, 2000.

5. Грязнева Т.Н. Смирнова Е.А. Приготовление пробиотической кормовой добавки КД-5. Клиническое питание. 2007; 1–2: 66–67.

6. Фадеенко Г.Д., Куринная Е.Г., Вовченко М.Н. Нутригеномика и нутри-

- генетика: возможности практического применения. Соучастна гастроэнтерология. 2015; 6(86): 7.
7. Данилов А.И., Жаркова Л.П. Антибиотикорезистентность: аргументы и факты. Клин. фармакол. тер. 2017; 26(5): 6–9.
  8. Данилов С.Н. Респираторные заболевания телят в промышленном животноводстве. Ветеринария. 2011; 3: 12–14.
  9. Данилов А.И., Литвинов А.В. Начало эры антимикробной химиотерапии. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010; 12(2): 163–169.
  10. Зинченко Е.В., Панин А.Н. Иммунопробыотики в ветеринарной практике. ОНТИ ПНЦ РАН. Пущино. 2000; 17–22.
  11. Зюбин И.Н., Смирнов П.Н. Патогенетические аспекты, терапия и профилактика метритов у коров и телок. Новосибирск: ООО «Ревик-К». 2001; 74–77.
  12. Мечников И.И. «Этюды о природе человека». 2-е изд. М.: Научное слово, 1905; 12–15.
  13. Информационный бюллетень ВОЗ. Спецвыпуск. Ноябрь. 2016.
  14. Кузнецова Е.А., Альдяков А.В. Изучение действия тетрациклина пролонгированного действия при инфекционных болезнях крупного рогатого скота. Ветеринарный врач. Казань. 2010; 6: 39–40.
  15. Мищенко В.А., Мищенко А.В., Думова В.В. Анализ причин выбытия крупного рогатого скота мясных пород. Ветеринария Кубани. 2014; 3: 19–22.
  16. Мищенко В.А., Думова В.В., Черных О.Ю. Особенности массовых ассоциированных респираторных заболеваний взрослого КРС. Ветеринария Кубани. 2011; 3: 13–15.
  17. Малик Н.И., Панин А.Н. Ветеринарные пробиотические препараты. Ветеринария. 2001; 1: 46–51.
  18. Малик Н.И. Новые пробиотические препараты ветеринарного назначения: дис. ... д-ра биол. наук. М., 2002; 24–25.
  19. Париков В.А., 1990; Батраков А.Я., 1991; Слободянник В.И., 1994; Кузьмин Г.Н., 1995; Подберезный В.В., 1995; Попов Л.К., 1998; Гасанов Н.Г., 1999; Родин В.П., 2002.
  20. Панин А.Н., Комаров А.А., Куликсовский А.В., Макаров Д.А. Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных. Ветеринария и зоотехния: ветеринария. 2017; 5. УДК 619:615.33.
  21. Панин В.А. Применение препарата «Бифидогенная добавка «Ветелакт» для лечения и профилактики дисбактериозов телят. Дис. ... канд. вет. наук. 2003; 17–22.
  22. Хурса Р.В., Месникова И.Л., Микша Я.С. Кишечная микрофлора: роль в поддержании здоровья и развитии патологии, возможности коррекции. Учебно-методическое пособие. БГМУ. Минск. 2017; 5–10.
  23. Роман Л.Г., 2010; Климов Н.Т., Таганрог. гос. пед. ин-т. 2015.
  24. Соколенко Г.Г., Лазарев Б.П., Миньченко С.В. Пробиотики в рациональном кормлении животных. Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК — продукты здорового питания. 2015; 1: 72–77.
  25. Смирнов В.В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты. Медикаменты и фармпрепараты. Медицинская картотека мира. Ликування та диагностика. 1998; 2: 28–36.
  26. Тараканов Б.В., Шавырина Т.А., Гущин Н.Н. Способ кормления лактирующих коров. Патент СССР № 17900380.
  27. Шкиль Н.Н. Анализ изменения антибиотикочувствительности возбудителей заболеваний телят. Вестн. НГАУ. 2015; 3(36): 107–115.

28. Шоттелиус М. Бактерии, заразные болезни и борьба с ними. Пер. с нем.; под ред. [и с предисл.] прив.-доц. Моск. ун-та А.И. Абрикосова. М.: Космос, 1912; XII: 11–21.
29. [https://irena.vetrf.ru/irena/operatorui?\\_action=clearRegListMedicine](https://irena.vetrf.ru/irena/operatorui?_action=clearRegListMedicine). Электрон. ресурс.
30. Anthony J., Burns Ian, Rowland R. Antigentotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water include DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research*. 2004; N551: 233–243.
31. Ahsan A.S.M.L., Agazzi A., Invernizzi G., Bontempo V., Savoini G. The beneficial role of Probiotics in monogastric animal nutrition and health. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. 2015; 2(4): 116–121.
32. Bernd-Alois Tenhagen. Abstracts. 4<sup>th</sup> International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals, 2015.
33. Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance. Rome. Codex Alimentarius Commission. 2005 ([http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10213/CXP\\_061e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10213/CXP_061e.pdf), accessed 20 January 2011).
34. Code of Practice on Good Animal Feeding. Rome. Codex Alimentarius Commission. 2004 ([http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10080/CXP\\_054e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10080/CXP_054e.pdf), accessed 20 January 2011).
35. Ching C. et al. Interferon therapy in chronic hepatitis patient: Immunomodulatory and antiviral effects. *J. Immunol*. 1994; 152(6): 3235.
36. Elisabeth Okholm Nielsen. 4<sup>th</sup> International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals. 2015; 32.
37. Fuller R. Probiotics in man and animals. A review. *J. Appl. Bacteriology*. 1989; 66(5): 365–378.
38. FDA releases 2014. NARMS integrated Report. 2016.
39. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. Rome. Codex Alimentarius Commission. 2009 ([http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11252/CXG\\_071e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11252/CXG_071e.pdf), accessed 20 January 2011).
40. Hornish R.E., Katarski S. Cephalosporins in veterinary medicine-ceftiofur use in food animals. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002; 2: 717–731. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052187>.
41. Hornish R.E., Katarski S. Cephalosporins in veterinary medicine-ceftiofur use in food animals. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002; 2: 717–731. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052187>.
42. Hetty van Beers-Schreurs. 4th International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals, 2015.
43. Harper H. A., Rodwell V.W., Meyers P.A. Digestion and absorption from the gastrointestinal tract. Chapter 17. *Review of Physiologist Chemistry*, 17<sup>th</sup> Edition. Lange Medical Publication. Los Altos, California. 1989.
44. Jean-Pierre Orand. 4th International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals, 2015.
45. Mehdi Bahari. A Review on the Consumption of Probiotics in Feeding Young Ruminants. Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences. ISSN: 2576–9162; 28–30.
46. Oberreuther-Moschner D.L., Jahres G., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. Dietary intervention with probiotics Lactobacillus acidophilus 145 and Bifidobacterium longum 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clonel19Acell. *Br. J. Nutr.* 2004; 19(6): 925–927.
47. OIE list of antimicrobials of veterinary importance. Paris. World Organisation for Animal Health. 2007 (<http://web>.

- oie.int/downld/Antimicrobials/OIE\_list\_antimicrobials.pdf, accessed 24 February 2011).
48. Revised guideline on the summary product characteristics for antimicrobial products. London. European Medicines Agency. 2007 (EMEA/CVMP/ SAGAM/383441/2005; [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guide-line/2010/02/WC500070670.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guide-line/2010/02/WC500070670.pdf), accessed 24 February 2011).
49. Scott H. Podolsky. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Nature Palgrave Communications.* 2018; 4(124). <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0181-x>;
50. Schwarz et al. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet. Dermatol.* 2017.
51. Von Wintersdorff et al. *Front Microbiol.* 2016; 7: 173.

# VI. ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Верховский О.А.

В патологии крупного рогатого скота особое место занимают инфекционные болезни, обусловленные вирусами, бактериями, простейшими, паразитами, распространенные повсеместно и представляющие собой серьезную проблему для промышленного животноводства. Большинство из них невозможно распознать только по клиническим признакам и патологоанатомическим изменениям, поэтому окончательный диагноз ставится только после лабораторного подтверждения. Наиболее опасные инфекционные болезни, такие как ящур, блютанг, энзоотический лейкоз, инфекционный ринотрахеит/инфекционный пусту-

лезный вульвовагинит (ИРТ/ИПВ), вирусная диарея (ВД), туберкулез, бруцеллез и другие внесены в перечень болезней, методы диагностики и профилактики которых регламентируются стандартами Всемирной организации здравоохранения животных (ОIE) [20]. Лабораторная диагностика других инфекций (парагрипп-3 (ПГ-3), респираторно-синцитиальная (РСИ), рота-, корона- и аденоизвестные инфекции крупного рогатого скота и др.), не входящих в перечень болезней ОIE, проводится с учетом отечественных ветеринарных правил, методов и наборов, разрешенных к применению на территории РФ.

Таблица 1. Основные принципы лабораторной диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота

Цель исследования	Методология	
1) диагностика заболеваний, протекающих в острой, хронической или субклинической формах;	Идентификация возбудителя/структурных компонентов/секретируемых молекул	Используемые методы
2) выявление животных — носителей возбудителя инфекции в искомой популяции;	Выделение возбудителя	Биопроба, выделение возбудителя в культуре клеток или на питательных средах
3) диагностика латентных инфекций (если хозяин инфицирован, но репликации вируса нет);	Выявление антигена возбудителя	ИФА, ИХМ, РИФ, ИГХ, ИПО
4) оценка колострального иммунитета у животных в ранний постнатальный период;	Выделение и детекция геномной нуклеиновой кислоты	ПЦР, биочипы, методы секвенирования генов
5) проведение эпизоотологического мониторинга, оценку заболеваемости животных в заданном регионе и оценку риска инфицирования животных и человека;	Выявление специфических антител	РН, РТГА, РМА, РА, РСК, ИФА, ИХМ, РИФ, ИГХ, ИБ
6) подтверждение статуса здоровья животных (животные не только не больны, но и не инфицированы)	Выявление цитокинов	ИФА

*Примечание:* ИФА — иммуноферментный анализ; ИХМ — иммунохроматографический метод; РИФ — реакция иммунофлуоресценции; ИГХ — иммуногистохимический метод; ИПО — метод иммунопероксидазного окрашивания вируса в монослое культуры клеток; ПЦР — полимеразная цепная реакция; РН — реакция нейтрализации; РТГА — реакция торможения гемагглютинации; РМА — реакция микроагглютинации; РА — реакция агглютинации; РСК — реакция связывания комплемента; ИБ — иммуноблоттинг.

Основные принципы лабораторной диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота аналогичны таковым, применяющимся для других видов животных и человека (*табл. 1*). При их диагностике следует учитывать потенциальную мультифакторную этиологию болезни, клинические признаки ее проявления, серологическую картину, возможность бессимптомной персистентной инфекции, а также возможное использование живых вакцин.

При этом ОИЕ рассматривает в качестве основных следующие цели лабораторной диагностики:

- 1) подтверждение отсутствия инфекции в популяции животных;
- 2) подтверждение отсутствия инфекции у индивидуального животного перед транспортировкой;
- 3) оценка эффективности оздоровительных мероприятий;
- 4) подтверждение положительных случаев заболевания;

**Таблица 2. Основные иммунологические методы лабораторной диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота**

Название метода	Принцип метода	Пример использования в диагностике
Реакция агглютинации (РА)	Реакция основана на использовании взвеси бактерий и соответствующей антибактериальной сыворотки крови. Результатом реакции является формирование агглютинации, т.е. группы склеенных бактерий (клеток), выпавшей в осадок под действием антител в присутствии электролита	Бруцеллез; лептоспироз
Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)	Реакция основана на феномене подавления (торможения) агглютинации эритроцитов вирусом в присутствии вирус-специфических антител. В процессе реакции антигены вируса связываются с антителами иммунной сыворотки крови, в результате чего формируется иммунный комплекс антиген–антитело и вирус теряет свойство агглютинировать эритроциты	Парагрипп-3
Метод двойной иммuno-диффузии по Оухтерлони (РДИ)	Метод основан на образовании специфических иммунных комплексов (полос преципитации) в зоне эквивалентности диффузии в геле антигенов и антител, видимых визуально или при окрашивании. Особенностью метода является то, что каждая пара антиген–антитело формирует индивидуальную полосу преципитации, и реакция не зависит от наличия в исследуемой системе других антигенов и антител. Метод одновременно носит качественный и количественный характер	Энзоотический лейкоз; паратуберкулез
Реакция связывания комплемента (РСК)	Реакция основана на способности субкомпонента комплемента C1q и затем других компонентов системы комплемента связывать иммунные комплексы. Позволяет титровать антигены или антитела по степени фиксации комплемента комплексом антиген–антитело	Бруцеллез; контактизная плевропневмония

- 5) проведение эпизоотологического мониторинга инфекции;
- 6) оценка иммунного статуса индивидуального животного или популяции животных после проведения вакцинации.

## 1.1. Иммунологические методы диагностики

За истекшие годы были достигнуты значительные успехи в развитии ряда прикладных направлений современной ветеринарной иммунологии, включая решение общих иммунологических проблем, приведших к расширению арсенала средств иммунодиагностики и специфической профилактики болезней животных и человека. Иммунологические (иммунодиагностические) методы, основанные на количественной оценке прямого взаимодействия в системе антиген (эпитоп) – антитело (паратоп) *in vitro*, занимают ведущее место в структуре современных лабораторных диагностических исследований (*табл. 2*).

продолжение таблицы

Название метода	Принцип метода	Пример использования в диагностике
Реакция нейтрализации (РН)	Представляет собой реакцию определения иммунологической специфичности антигенов и антител по феномену утраты их биологической активности после взаимодействия. Основана на способности антител нейтрализовать некоторые специфические функции макромолекулярных или растворимых антигенов, например активность ферментов, токсины бактерий, инфекционную активность вирусов. Обычно применяют различные варианты РН в культуре клеток, на куриных эмбрионах и животных	ВД КРС; блотанг
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Метод основан на специфическом взаимодействии антигенов и антител, одни из которых иммобилизованы на поверхности лунок полистироловой микропанели, вторые присутствуют в исследуемом материале, формируя при этом комплекс антиген–антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется после взаимодействия с конъюгатом (меченым антителом), фермент которого (пероксидаза хрина, щелочная фосфатаза или др.) вызывает разложение субстрата-индикаторного раствора и образование окрашенного продукта. При этом интенсивность окраски в лунке прямо (непрямой или «сэндвич» варианты ИФА) или обратно (конкурентный, блокирующий варианты ИФА) пропорциональна содержанию анализа в исследуемой пробе	Ящур; ИРТ/ИПВ
Иммуноблоттинг (ИБ)	Метод применяют для выявления антител к отдельным антигенам или распознавания антигенов с помощью известных антител. Постановка ИБ состоит из трех последовательных этапов: разделение биологических макромолекул на отдельные белки с помощью электрофореза в поликариламидном геле; перенос разделенных белков из геля на твердую подложку, например на нитроцеллюлозную мембрану (блот); выявление на подложке искомых белков с помощью прямого или непрямого ИФА	Трансмиссивная губкообразная энцефалопатия; контагиозная плевропневмония
Иммуногистохимический метод (ИГХ)	Метод предназначен для выявления антигенов на поверхности или внутри клетки. Для этого используют или иммунофлуоресценцию, или иммуноферментный конъюгат с пероксидазой хрина. О количестве специфических антигенов судят по интенсивности окрашивания	Лихорадка Рифт–Валли; трансмиссивная губкообразная энцефалопатия
Иммунохроматографический метод (ИХМ)	Метод представляет собой гомогенный вариант ИФА, проводимый на мембранных пористом носителе за счет латеральной диффузии реагентов. ИХМ является наиболее экспрессным и простым в постановке тестом и предназначен для быстрого и одностадийного выявления антигена или антител с использованием хроматографических мембран (иммunoстрips) в качестве твердого носителя и иммобилизованных на них в различных зонах антител, один из которых мечены колloidным золотом или другим маркером. В идеальном варианте метод по чувствительности и специфичности не уступает гетерогенному ИФА, а по простоте постановки и удобству в использовании превосходит все ныне существующие диагностические методы	Применяется в качестве скринирующего (но не подтверждающего) теста при ряде инфекций, идет процесс валидации метода для выявления вируса ящура
Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)	Принцип метода заключается в использовании меченных флюорохромом антител и последующей детекции комплекса антиген–антитело под микроскопом в УФ-лучах, возбуждающих свечение флюорохрома. Реакцию прямой иммунофлуоресценции (РПИФ) используют для изучения клеточных антигенов, выявления вируса в зараженных клетках и обнаружения бактерий и риккетсий в мазках. Метод непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), основанный на выявлении комплекса антиген–антитело с помощью люминесцирующих антител, часто используется для титрования антител	Тейлериоз; бабезиоз

Кроме вышеперечисленных (табл. 2), для диагностики таких инфекционных болезней крупного рогатого скота, как туберкулез и паратуберкулез, используются иммунологические методы, на-

правленные на оценку гиперчувствительности замедленного типа в ответ на введение аллергена. Они относятся к клеточным диагностическим методам, базирующемся на взаимодействии анти-

генов микобактерий с рецепторами клеток иммунной системы, проходящих как *in vivo* (внутрикожная туберкулиновая пробы — ВТП), так и *in vitro* («сэндвич»-ИФА на основе моноклональных антител, предназначенный для выявления  $\gamma$ -интерферона в крови инфицированных животных —  $\gamma$ -ИФН-ИФА).

## 1.2. Развитие современной иммунодиагностики в животноводстве

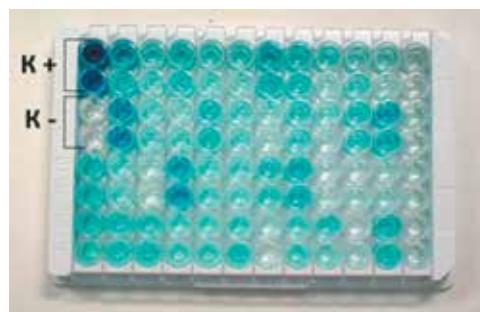
В настоящее время в иммунодиагностике инфекционных болезней крупного рогатого скота доминирующую позицию занимают методы, напрямую оценивающие связывание антигена с антителами (различные варианты ИФА, РИФ), и, в меньшей степени, менее чувствительные методы, оценивающие результат взаимодействия антиген-антитело по феномену преципитации (РДП), агглютинации (РА, РТГА), нейтрализации (РН) и связывания комплемента (РСК). За два последних десятилетия в лабораторную практику нашей страны были внедрены простые и надежные наборы на основе ИФА, ИХМ и РИФ, созданные с использованием последних достижений иммунобиотехнологии (моноклональные антитела, рекомбинантные антигены, высокоэффективные химические составляющие), обладающие высокой чувствительностью и специфичностью [2–4]. Специалистами АНО «НИИ ДПБ» и ООО «Ветбиохим» (г. Москва, Россия) было впервые налажено производство подобных ИФА-наборов, уже много лет используемых в ветеринарных лабораториях нашей страны для диагностики ИРТ/ИПВ, ВД КРС, РСИ, блютанга, энзоотического лейкоза и др. (рис. 1).



А



В



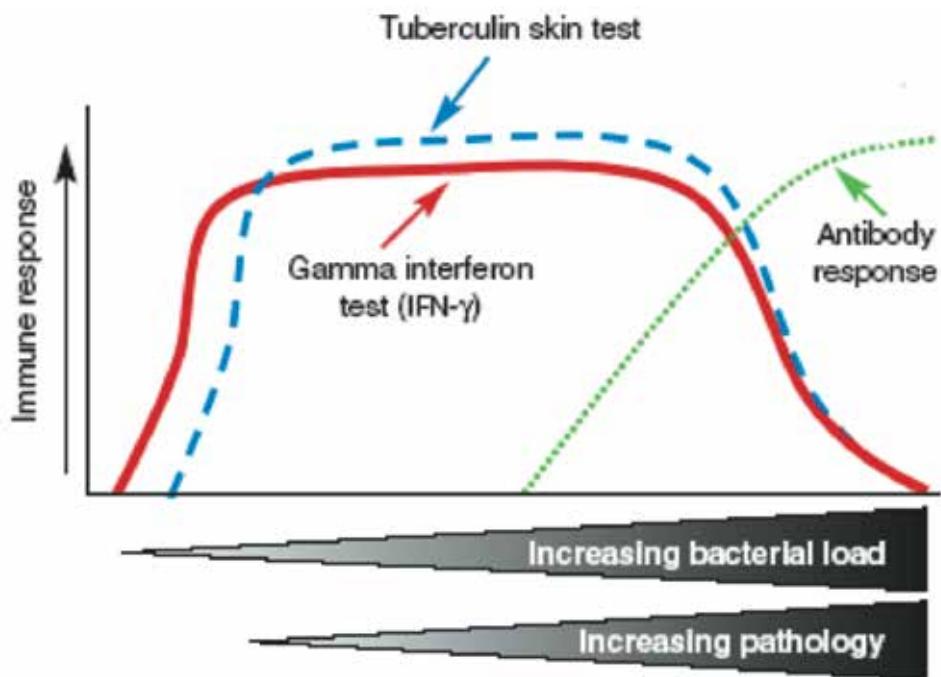
С

Рис. 1. Современные ИФА-наборы, использующиеся в лабораторной иммунодиагностике. А, В — готовые коммерческие наборы в комплекте; С — результаты проведения реакции с сыворотками крови телят

Некоторые из них являются уникальными, например ИФА-набор «Гиподерма-Серотест», предназначенный для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота и разработанный в результате исследований, проведенных по государственному контракту №1161/13 от 16.10.2007 (рис. 1В). Метод основан на выявлении антител к гиподермину С (гиподермотоксину), синтезируемому личинкой первой стадии подкожного овода из отряда Diptera — *H. bovis* и *H. lineatum*. При этом теоретической предпосылкой создания ИФА послужил факт формирования выраженного гуморального иммунного ответа у восприимчивого поголовья через 4–8 недель после проникновения личинки первой стадии овода под кожу животного. Тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет выявить специфические антитела даже при наличии одной личинки в организме животного как в индивидуальных, так и в объединенных пробах (до 10) сыворотки крови и молока крупного рогатого скота. Набор предназначен для ранней диагностики заболевания, что на практике позволяет сократить масштабы проводимой химиопрофилактики гиподерматоза, а также весенних обследований животных [11]. В 2008 г. ИФА-набор был апробирован в практических условиях в восьми областях РФ, в установленном порядке были утверждены «Методические рекомендации по применению иммуноферментного метода ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота и его использованию при оздоровлении от этого заболевания», и с тех пор ИФА-набор «Гиподерма-Серотест» выпускается на регулярной основе.

Для химиопрофилактики паразитарных болезней крупного рогатого скота часто применяются препараты, содержащие ивермектин или его производные, остаточные количества которых накапливаются в органах и тканях животных и выделяются из организма с молоком. Это представляет серьезную угрозу для потребителей данной продукции, поэтому количественный анализ химических соединений в организме животных и продуктах животного происхождения является важной мерой сохранения здоровья населения. Исходя из этого, в рамках развития стратегии борьбы с гиподерматозом специалистами АНО «НИИ ДПБ» были получены уникальные моноклональные антитела к ивермектину и разработан ИФА для выявления остаточных количеств ивермектинсодержащих соединений в продуктах животного происхождения [13]. Выпускаемый в настоящее время ООО «Ветбиохим» набор «Ивермектин-ИФА» существенно облегчает работу ветеринарных лабораторий по контролю качества молока, мяса и продуктов переработки после применения животным противопаразитарных и антигельминтных средств, способствуя тем самым обеспечению пищевой безопасности нашей страны.

В начале 2000-х годов в ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко проходил апробацию ИФА-набор, предназначенный для ранней диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, основанный на выявлении  $\gamma$ -ИФН в крови животных, инфицированных *M. bovis* ( $\gamma$ -ИФН ИФА). Как и ВТП, данный метод направлен на оценку функциональной активности Т-лимфоцитов, поскольку известно, что на субклинической стадии туберкулеза доминирующим является клеточный иммунный ответ, в который вовлечены Т-клетки, макрофаги и цитокины (рис. 2).



**Рис. 2. Иммунопатогенез при туберкулезе крупного рогатого скота.** Субклиническая стадия характеризуется наличием клеточного иммунного ответа, синтезом  $\gamma$ -ИФН и низкой бактериемией. Стадия с проявлением клинических признаков характеризуется наличием гуморального иммунного ответа, сильной бактериемией, наличием клинической картины болезни и патоморфологических изменений органов и тканей [18]

Теоретической основой разработки  $\gamma$ -ИФН ИФА является тот факт, что в крови зараженных туберкулезом животных присутствуют сенсибилизованные Т-лимфоциты, способные к специальному распознаванию антигенов ППД-туберкулина. В процессе иммунологического распознавания происходит стимуляция Т-клеток и, как следствие этого, выделение цитокина —  $\gamma$ -интерферона, определяемого в крови методом «сэндвич»-ИФА. Обнаружение  $\gamma$ -ИФН свидетельствует о наличии возбудителя туберкулеза в организме исследуемого животного (рис. 3).

В настоящее время метод используется в США, Ирландии, Испании, Аргентине, Бразилии и других стра-

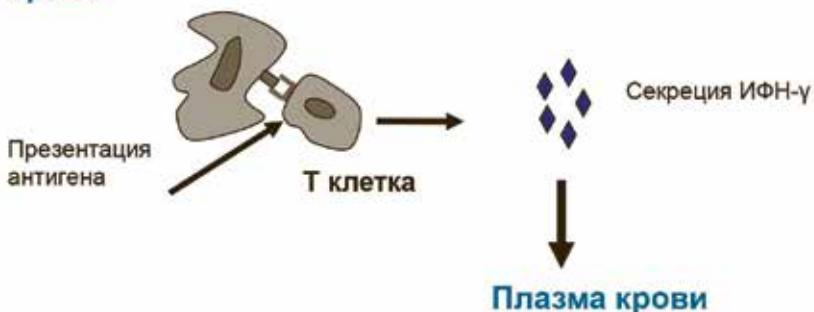
нах мира и является методом, рекомендованным ОIE для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. В большинстве случаев  $\gamma$ -ИФН ИФА используется совместно с ВТП и максимальная эффективность при диагностике болезни достигается при параллельной интерпретации результатов обоих методов.

Целью экспериментов, проведенных в ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, было изучение динамики содержания  $\gamma$ -ИФН в крови экспериментально зараженных бычков и сравнительное изучение диагностической эффективности ВТП и  $\gamma$ -ИФН ИФА в благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйствах РФ. Было установлено, что метод позволяет проводить более ран-

### Этап 1

Инкубация крови с ППД-туберкулина *in vitro*  
в течение 24 час для индукции ИФН- $\gamma$

### Кровь



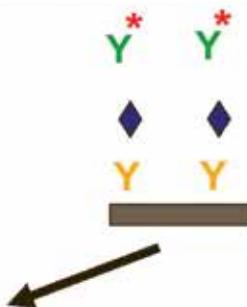
### Этап 2

Постановка «сэндвич»-ИФА для выявления ИФН- $\gamma$   
в плазме крови

Моноклональные антитела к ИФН- $\gamma$ -ченные пероксидазой хрена (детектирующие)

ИФН- $\gamma$  в плазме крови

Моноклональные антитела к ИФН- $\gamma$  (захватывающие)



### Интерпретация результатов ИФА:

Лимфоциты от здоровых животных → отсутствие ИФН- $\gamma$

Лимфоциты от инфицированных  
микобактериями коров → наличие ИФН- $\gamma$

Рис. 3. Методология лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота,  
направленная на выявление секреируемого  $\gamma$ -интерферона у зараженных животных

нюю диагностику туберкулеза в эксперименте (*табл. 3*).

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что в животноводческих хозяйствах  $\gamma$ -ИФН ИФА

целесообразно использовать как дополнительный метод прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в целях дифференциации аллергических реакций на туберкулин.

Таблица 3. Динамика формирования Т-клеточного иммунного ответа у телят, экспериментально зараженных вирулентной культурой *M. bovis* (n=6), и диагностическая ценность ВТП и  $\gamma$ -ИФН ИФА

Время п.з., сут.	Результаты $\gamma$		Результаты ВТП, количество животных		
	положительных	отрицательных	положительных	кожная реакция, мм	отрицательных
0	0	6	0	—	6
7	0	6	0	—	6
14	0	6	0	—	6
21	0	6	0	—	6
28	0	6	0	—	6
35	1	5	0	—	6
65	4	2	0	—	6
85	5	1	2	5–8	4
110	6	0	4	6–10	2
135	6	0	6	6–12	0

Исследования с помощью  $\gamma$ -ИФН ИФА рекомендуется проводить через 7–30 суток после проведения плановой туберкулинизации [12].

Многолетние широкомасштабные исследования были проведены нашими специалистами совместно с коллегами из профильных государственных организаций с целью внедрения в ветеринарную лабораторную практику Российской Федерации ИФА для диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. К началу 2000-х годов в региональных ветеринарных лабораториях нашей страны этот метод был практически неизвестен, однако начиная с 2002 г., когда в «НПО НАРВАК» было наложено производство «Набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) методом иммуноферментного анализа (ИФА)» в скринирующем и подтверждающем вариантах, произошло значительное расширение проводимых исследований и, как следствие, повысилась эффективность противолейкозных мероприятий [6]. В настоящее время ИФА наряду с реакцией иммунодиффузии в геле агара (РИД) являются двумя наиболее эффективными методами диагностики этого заболевания, рекомендованными ОIE [20].

В сравнительных исследованиях по оценке диагностической эффективности ИФА и РИД были использованы сыворотки крови телят (n=169), полученные в динамике с первого по шестой месяц после рождения от серопозитивных коров (РИД+) в неблагополучных по лейкозу хозяйствах Ивановской (n=5) и Владимирской (n=2) областей с разным уровнем инфицированности стад ВЛКРС [7]. Проведенный статистический анализ полученных результатов свидетельствует о том, что существует достаточно высокая корреляционная связь между показателями, характеризующими количественное содержание антител к ВЛКРС в ИФА, и диагностическую чувствительность РИД (рис. 4).

В результате был разработан алгоритм серологических исследований на лейкоз, заключающийся в следующем (рис. 5). Обладая более низкой по сравнению с ИФА чувствительностью, РИД можно использовать только на первом этапе мероприятий при оздоровлении неблагополучных хозяйств от лейкоза. В дальнейшем отрицательно реагирующие в РИД животные должны исследоваться в ИФА и только после получения отрицательного результата животное можно считать серонегативным.

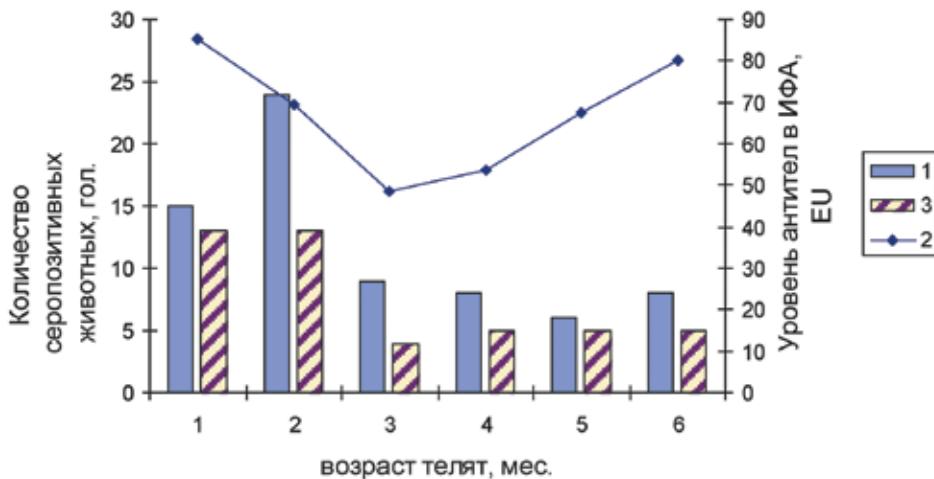


Рис. 4. Диагностическая эффективность ИФА и РИД в соотношении с количественными показателями содержания антител к ВЛКРС в сыворотке крови телят. 1, 3 — количество животных, положительно реагирующих в ИФА и РИД соответственно; 2 — уровень вирус-специфических антител, установленный в ИФА. Приведены среднегеометрические значения величин

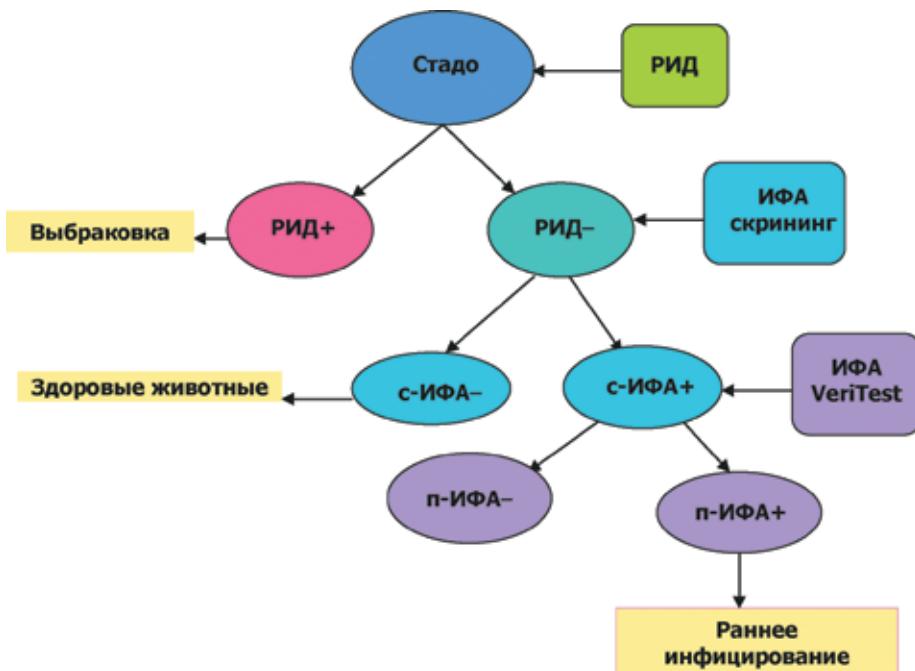


Рис. 5. Схема серологического обследования неблагополучного по лейкозу хозяйства независимо от степени инфицирования поголовья: с-ИФА — скринирующий тест; п-ИФА — подтверждающий тест (ИФА-набор VeriTest); «—» и «+» — отрицательные и положительные пробы (животные) соответственно. По возможности вместо скринирующего ИФА-набора можно сразу же использовать ИФА-набор VeriTest и тем самым упростить алгоритм серологического обследования и сократить число необходимых анализов [5]

Подобная схема оздоровительных мероприятий была впервые апробирована в неблагополучных хозяйствах Ивановской области [7, 8] и затем во многих регионах РФ.

В дальнейшем многие специалисты включили в эту схему ПЦР для более эффективного обследования телят на лейкоз [16].

В опыте по изучению возрастной динамики содержания антител у телят, рожденных от матерей, инфицированных ВЛКРС, было установлено, что из 25 родившихся незараженных телят, своевременно и в достаточном количестве получивших молозиво матери, у 22 (88%) колостральные антитела к ВЛКРС исчезали к пятимесячному возрасту (рис. 6). Только у трех животных они находились на диагностическом уровне более продолжительное время и исчезли к 7–8 месяцу после рождения [8].

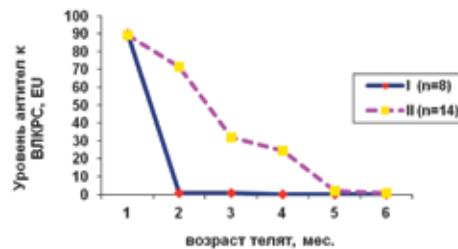


Рис. 6. Динамика содержания колостральных антител к ВЛКРС в сыворотке крови здоровых телят, рожденных от серопозитивных коров, с изначально одинаковым уровнем колостральных антител. У животных I группы они исчезали уже на втором месяце, тогда как у телят II группы их можно было выявлять до 4–5-месячного возраста

У телят, зараженных ВЛКРС внутриутробно или постнатально, при своевременной выпойке молозива высокий уровень антител сохранялся в течение всего срока наблюдения, а у безмолозивных животных антитела к ВЛКРС выявлялись начиная с 2–3-месячного возраста (рис. 7).

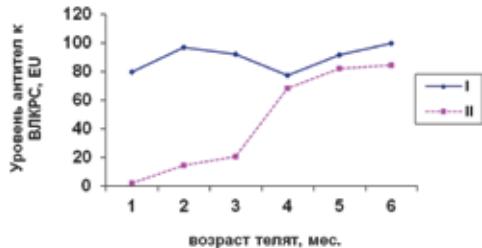


Рис. 7. Динамика вирус-специфических антител в сыворотке крови заразившихся ВЛКРС телят, рожденных от серопозитивных коров. I группа — телята, своевременно получившие материнское молозиво с высоким исходным уровнем антител в крови; II — телята, не получившие молозиво матери, без колостральных антител в крови. Штрих-пунктирной линией показано значение отрицательной реакции в ИФА (<10 EU)

Таким образом, у телят, зараженных ВЛКРС внутриутробно или постнатально, уровень антител сохраняется на достаточно высоком уровне на протяжении первых шести месяцев после рождения при условии, что животные получили достаточное количество колостральных антител с первой порцией молозива. У безмолозивных телят антитела к ВЛКРС выявляются в ИФА в 2–3-месячном возрасте, и их содержание, начиная с этого временного промежутка, неуклонно повышается. Очевидно, что этот возраст соответствует началу формирования собственного активного вирус-специфического иммунного ответа. Результаты данного исследования можно использовать для практических целей и применять метод ИФА для раннего выявления телят, зараженных ВЛКРС. Для этого необходимо исследовать парные сыворотки крови телят, взятые с интервалом 2–3 недели у 3–4-месячных животных. При выраженному приросте уровня антител в диагностируемом диапазоне ( $\geq 10$  EU) или одинаково высоком их содержании в двух исследованиях можно с высокой степенью вероятности констатировать инфицирование теленка ВЛКРС [8].

Эффективность серологической диагностики инфекционных болезней крупного рогатого скота зависит от ряда факторов. При изучении их был проведен ряд исследований, посвященных ее оценке при инфицировании животных несколькими патогенами, и установлен эффект интерференции как между гетерологичными возбудителями, так и между вакцинными и полевыми штаммами вирусов. Например, одновременное заболевание крупного рогатого скота лейкозом и фасциолезом, так же как и ранее проведенная вакцинация поливалентными противовирусными вакцинами, негативно влияет на конечный результат РИД и ИФА. При устраниении вторичного иммунодефицита и преодоления последствий инвазии можно

выявить дополнительно латентных вирусоносителей и избежать получения недостоверных результатов [9, 10].

Резюмируя имеющиеся на сегодняшний день данные, можно сделать вывод о том, что современная иммунодиагностика вирусных болезней в животноводстве базируется прежде всего на ИФА. Такие традиционные серологические методы, как РН и РТГА, которые невозможно перевести в формат наборов, используются непосредственно в диагностических лабораториях, имеющих возможность работы с соответствующими штаммами вирусов и культурами перевиваемых линий клеток (*рис. 8*). При этом их удельный вес в комплексе диагностических средств, применяемых в животноводстве, постепенно снижается.

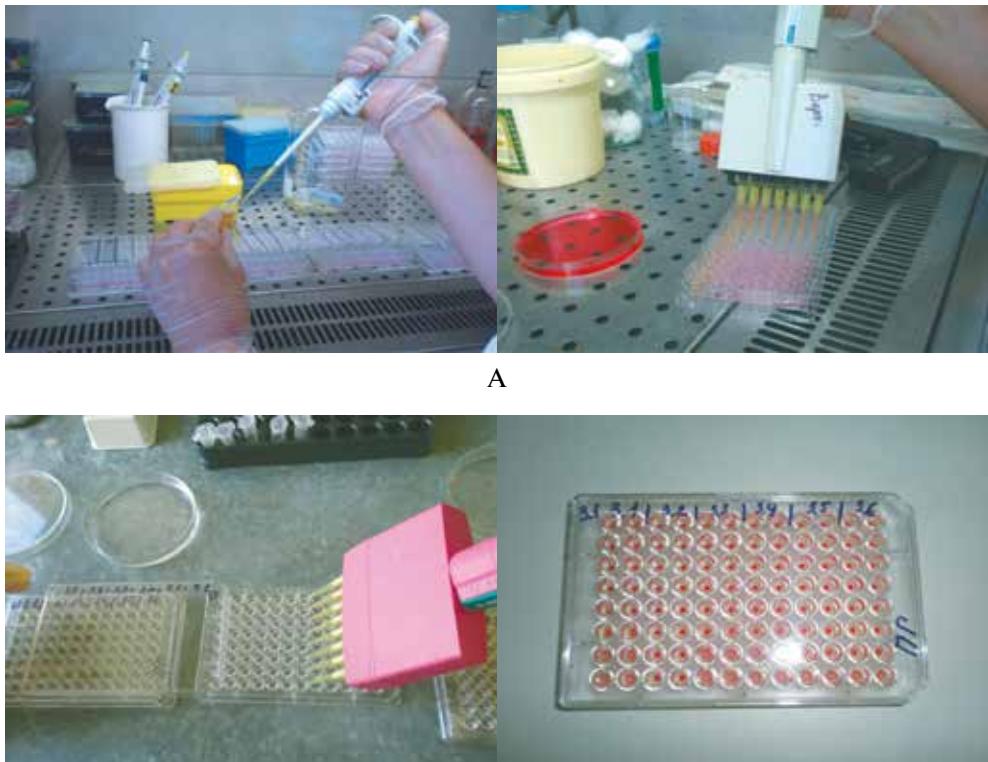


Рис. 8. Отдельные этапы постановки РН (А) и РТГА (В) в нашей лаборатории по определению титров антител к вирусам ИРТ/ИПВ и ПГ-3 КРС соответственно

Вместе с тем при диагностике таких болезней, как: бруцеллез, лептоспироз, паратуберкулез и ряд других (см. соответствующие разделы), традиционные серологические методы применяются достаточно часто, особенно в комплексе исследований в спорных или сомнительных случаях.

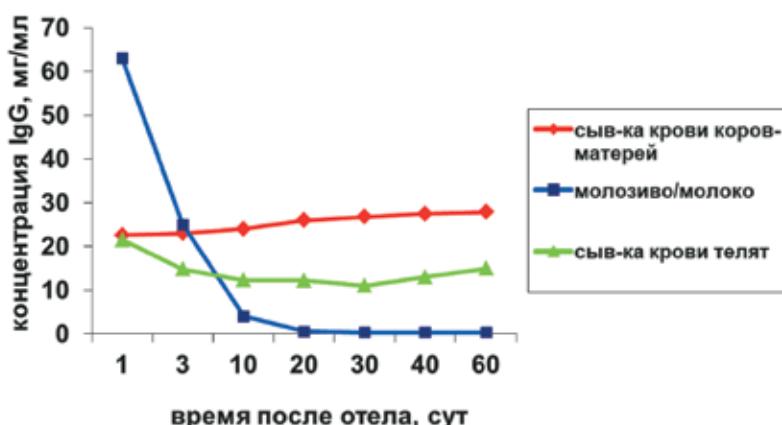
### **1.3. Серологическое обследование телят и его значение в комплексном подходе к диагностике инфекционных болезней**

На практике традиционное серологическое обследование телят проводят вышеперечисленными методами с тремя основными целями:

- 1) ретроспективная диагностика инфекционного заболевания (исследование парных сывороток крови, взятых с интервалом в 14–21 день);
- 2) оценка напряженности иммунитета и иммунологической эффективности вакцинных препаратов;
- 3) определение уровня колостральных антител у молодняка в первые дни (недели) жизни.

Кроме того, определение серологического статуса поголовья является одним из подходов для изучения механизмов формирования иммунитета и роли различных факторов иммунной системы в патогенезе инфекционных болезней.

Вместе с тем особенности строения, формирования и функционирования иммунной системы крупного рогатого скота позволяют рассмотреть некоторые аспекты ранней диагностики инфекций при заражении телят внутриутробно или в ранний постнатальный период. Хорошо известно, что в ранний постнатальный период устойчивость организма теленка к патогенам обусловлена лактогенным (колостральным) иммунитетом, который формируется в результате пассивной передачи новорожденным растворимых факторов, определяющих иммунный статус и включающих в себя иммуноглобулины (Ig's), клеточные компоненты, неспецифические факторы и полезную микрофлору с молозивом матери. При этом решающую роль в предотвращении инфекционных заболеваний играет IgG, от концентрации которого в сыворотке крови зависят показатели заболеваемости и смертности новорожденных телят (*рис. 9*).



**Рис. 9. Сравнительный анализ количественного содержания IgG в сыворотке крови, молозиве/молоке коров-матерей и сыворотке крови рожденных от них телят, получивших молозиво в первые 12 часов жизни [1]**

При этом, не имея активного специфического иммунитета, при внутриутробном заражении у телят тем не менее возникает иммунный ответ, наличие которого можно определить, исследуя их сыворотку до приема первой порции молозива, т.е. у безмолозивных животных. Эффективность этого подхода особенно очевидна при исследовании на ИРТ/ИПВ и ВД КРС с целью выявления персистентно инфицированных животных.

Инфицирование плода во время стельности является одним из наиболее распространенных путей попадания вируса в стадо. В этом случае рассматриваются несколько возможных вариантов. Так, если заражение коровы вирусом ВД происходит до 150 дня стельности, то это будет означать, что инфицирование плода осуществилось до начала формирования его собственной иммунной системы. В этом случае белки вируса распознаются иммунной системой плода как собственные, поэтому формируется состояние иммунотолерантности, при которой клеточный и гуморальный иммунный ответ у плода отсутствуют. Если теленок рождается жизнеспособным, то он серонегативен, однако может выделять вирус во внешнюю среду. Для обнаружения таких телят их исследуют методом ПЦР (*рис. 10*). По статистике, в неблагополучных стадах примерно 1% от всех телят могут быть персистентно инфицированными.



Если заражение коровы вирусом ВД КРС происходит в последний триместр стельности, то это совпадает со временем становления собственной иммунной системы плода. В этом случае белки вируса распознаются иммунной системой как чужеродные, что закономерно приводит к развитию клеточного и гуморального иммунного ответа у плода. В результате новорожденные телята являются серопозитивными, и их можно выявить после исследования сыворотки крови, взятой до выпойки молозива, методами РН или ИФА (*табл. 4*).

Как видно из данных табл. 4, коровы-матери (№ 1–3) и телята после своевременной выпойки молозива (№4–6) характеризуются высоким уровнем вируснейтрализующих антител в сыворотке крови. В этом случае при заносе вируса в стадо невозможно дифференцировать постvakцинальные антитела от постинфекционных. Однако при обследовании безмолозивных телят наглядно видна разница между внутриутробно инфицированным (№7) и интактным (№8) телятами. В первом случае животное серопозитивно к вирусу ВД КРС, во втором — серонегативно по отношению ко всем тестируемым вирусам [15].

В практических условиях выявление персистентно-инфицированных животных экономически очень важно для пле-



Рис. 10. Обследование телят после биркования на наличие генома ВД КРС методом ПЦР.  
В качестве биоматериала используется ткань уха после выщипа

**Таблица 4. Уровень антител в сыворотке крови коров-матерей и колостральных вируснейтрализующих антител в сыворотке крови новорожденных телят**

№ п/п	Возрастная группа	Анамнез	Титр антител к вирусу в РН					
			ИРТ/ИПВ	ВД	ПГ-3	РС	РВ	КВ
1	корова	привита	1:512	1:128	1:512	1:16	1:32	1:16
2	корова	привита	1:512	1:128	1:128	1:32	1:32	1:16
3	корова	привита	1:512	1:128	1:256	1:32	1:32	1:32
4	Теленок 1 сут.	после выпойки молозива	1:128	1:64	1:256	1:32	1:32	1:32
5	теленок 1 сут.	после выпойки молозива	1:128	1:16	1:128	1:16	1:16	1:32
6	теленок 1 сут.	после выпойки молозива	1:512	1:128	1:256	1:32	1:32	1:32
7	теленок 1 сут.	безмолозивный	1:—*	1:32	1:—	1:—	1:—	1:—
8	теленок 1 сут.	безмолозивный	1:—	1:—	1:—	1:—	1:—	1:—

*Примечание: \* отрицательный результат, специфические антитела отсутствуют.*

менных хозяйств, хозяйств, проводящих оздоровительные мероприятия, центров по искусственному осеменению животных. К сожалению, ни один из существующих методов диагностики не позволяет выявить всех латентных носителей инфекции, поэтому наши рекомендации сводятся к систематически проводимому тестированию матерей и потомства разноплановыми методами, включая ПЦР и РН/ИФА.

#### **1.4. Развитие стратегии DIVA в животноводстве**

В настоящее время в странах с развитым животноводством развитию стратегии DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) способствует выраженный экономический эффект, связанный со своевременным выявлением вирусоносителей среди вакцинированного поголовья, резко снижая при этом распространение вируса в популяции. Основу стратегии DIVA составляет использование маркированных вакцин, не содержащих определенный антиген (маркер) в своем составе, и ИФА, роль которого заклю-

чается в дифференциации антител к структурному белку циркулирующего вирулентного вируса от антител к вакцинному маркеру, т.е. постинфекционных от поствакцинальных. В мировой практике наиболее показательным примером эффективности применения DIVA является стратегия борьбы с болезнью Ауески (БА) в свиноводстве [17]. У крупного рогатого скота подобный подход апробирован при ИРТ/ИПВ, ящуре и бруцеллезе с высокой степенью эффективности.

В случае ИРТ/ИПВ (как и в случае БА) используется вакцина, маркированная по гену гликопroteина E (gE), т.е. генетически и антигенно отличающаяся от полевого вирулентного вируса, и соответствующий ИФА-набор, предназначенный для выявления gE-антител в сыворотке крови. Таким образом, принцип дифференциации основан на отсутствии gE-антител у вакцинированных животных (при наличии антител к другим структурным белкам вируса, в частности к gB) и выявлении этих антител (как gE-, так и gB-специфических) у инфицированных.

**Таблица 5. Динамика выявления NSP-специфических антител в сыворотке крови телят, экспериментально зараженных вирулентным штаммом вириуса ящура, с использованием различных тест-систем**

Время после заражения животных, сут.	Разработанный конкурентный ИФА	Зарубежный аналог №1	Зарубежный аналог №2
6	0/3*	0/3	0/3
7	0/3	0/3	0/3
8	3/3	0/3	3/3
9	3/3	0/3	3/3
10	3/3	2/3	3/3
11	3/3	2/3	3/3
12	3/3	3/3	3/3
13	3/3	3/3	3/3
14	3/3	3/3	3/3

*Примечание:*\* количество положительных животных/количество тестированных животных.

В настоящее время регламент диагностических исследований на ящур включает в себя исследование сыворотки крови на наличие антител к неструктурным белкам (NSPs) вириуса. Известно, что зараженные животные содержат в крови антитела как к структурным, так и к NSPs вириуса, тогда как вакцинированные животные — антитела только к структурным белкам. Это объясняется тем, что NSPs отсутствуют (или скрыты для распознавания клетками иммунной системы) в вакцинных препаратах. Внедренные в практику коммерческие ИФА-наборы, предназначенные для выявления антител к NSPs вириуса ящура, характеризуются различной эффективностью, обусловленной специфичностью и аффинностью используемых в них моноклональных антител. Использование в ИФА рекомбинантного NSP вириуса ящура в качестве антигена также повышает чувствительность метода. В рамках выполнения международного проекта сотрудниками АНО «НИИ

ДПБ» и ФГБУ «ВНИИЗЖ» были получены моноклональные антитела к рекомбинантному ЗА NSP вириуса ящура и разработан ИФА для выявления антител в сыворотках крови всех видов восприимчивых животных. Предварительные сравнительные исследования показали высокую диагностическую чувствительность метода по выявлению NSP-специфических антител в сыворотке крови зараженных животных (*табл. 5*), специфичность теста также соответствовала требуемым критериям (*табл. 6*).

Использование подобных ИФА-наборов незаменимо при проведении оздоровительных и мониторинговых мероприятий прежде всего в тех регионах, где проводится профилактическая вакцинация скота против ящура.

В течение последних двадцати лет за рубежом стратегия борьбы с бруцеллезом включает в себя диагностические исследования, проводимые с помощью ИФА. В нашей стране первый диагностический ИФА-набор, отличительной

**Таблица 6. Определение диагностической специфичности конкурентного ИФА по выявлению NSP-специфических антител в сыворотке крови животных, вакцинированных против ящура**

	КРС	МРС	Свиньи
Количество положительных животных/количество тестированных животных	1/431	1/380	0/290
Специфичность, %	99,8	99,7	100

особенностью которого являлась способность дифференцировать животных, инфицированных *Brucella abortus* или *Brucella melitensis*, от животных, иммунизированных всеми типами аттенуированных слабоагглютиногенных вакцин (*B. abortus* штамм 82, *B. abortus* штамм 75/79-АВ, *B. abortus* штамм 19), был разработан в АНО «НИИ ДПБ» и после проведения двухлетних производственных испытаний зарегистрирован в 2009 г. [19]. В настоящее время ассортимент подобных наборов значительно расширился, кроме того, появились предварительные данные о возможности использования некоторых из них и в медицине.

## Заключение

В большинстве случаев для подтверждения диагноза и определения этиологической роли конкретного инфекционного агента в развитии болезни мы рекомендуем проведение комплекса диагностических исследований. Так, для эффективного оздоровления хозяйств от ИРТ/ИПВ, ВД крупного рогатого скота нами был предложен следующий алгоритм комплексных исследований:

1) исследование спермы быков-производителей методом ПЦР для исключения (или подтверждения) передачи вирусов в процессе осеменения коров;

2) исследование сыворотки крови безмолозивных телят на наличие противовирусных антител методами ИФА и РН для исключения возможности (или подтверждения) внутриутробного инфицирования плодов;

3) при наличии аборта — исследование биоматериала плода методом ПЦР на наличие вирусов;

4) обследование нетелей и телят:

— выявление специфических антигенов в сыворотке крови методами РН и ИФА;

— исследование биоматериала (особенно при наличии павших животных) методом ПЦР;

5) серологические исследования коров-матерей методами ИФА и РН, выборочно — исследование их секретов и смывов методом ПЦР на наличие возбудителя;

6) при получении положительных результатов ПЦР — проведение генетического анализа возбудителя методом секвенирования генов;

7) сопоставление результатов лабораторных исследований с результатами эпизоотологического обследования и патологоанатомического диагноза.

Такой комплексный подход позволяет нивелировать негативный диагностический эффект от бессистемного применения вакцин (прежде всего живых), является необходимым звеном в системе проведения дальнейших ветеринарно-санитарных мероприятий и основным аргументом для применения в хозяйстве тех или иных средств специфической профилактики.

В последние годы в мировой ветеринарной практике возросли требования как к препаратам, применяемым для специфической профилактики инфекционных болезней, так и к диагностическим наборам, позволяющим своевременно и достоверно выявлять многочисленные патогены на ранней стадии инфекционного процесса. Инновационные составляющие диагностики вывели ее на новый уровень чувствительности и специфичности, что позволило расширить спектр анализируемых патогенов, значительно улучшить параметры иммунодиагностических методов и усовершенствовать технологию производства коммерчески доступных диагностических наборов, предназначенных для выявления сверхмалых количеств биологических и химических веществ в организме животных, продуктах животноводства и окружаю-

щей среде. В инфектологии это особенно важно в случаях с неясной этиологией, появлении у животных необычных клинических признаков, при подозрении на появление новых вариантов возбудителей или эмерджентных инфекций, поскольку за последние десятилетия сформировался устойчивый тренд заноса возбудителей особо опасных инфекционных болезней животных на территорию нашей страны. Глобальное распространение вирусов, их эволюция, сопровождающаяся увеличением генетического разнообразия, появлением и распространением высоковирулентных штаммов, а также применение живых вакцин, в состав которых входят штаммы, не эндемичные для территории нашей страны, несет угрозу биобезопасности территории Российской Федерации. Это обстоятельство позволяет говорить о продолжающемся процессе развития диагностической составляющей ветеринарии и медицины в целом.

## Литература

1. Борзенко Е.В. Количественная характеристика иммуноглобулинов в биологических жидкостях крупного рогатого скота методами иммунохимического анализа: дис. ... канд. вет. наук. ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. М., 2005.
2. Верховский О.А., Поляков В.Ф., Алипер Т.И. Разработка и внедрение в практику методов иммунодиагностики инфекционных болезней животных. Ветеринария и кормление. 2018; 6: 6–8.
3. Верховский О.А. Моноклональные антитела в ветеринарной иммунодиагностике. Ветеринария и кормление. 2017; 3: 20–21.
4. Верховский О.А., Цибезов В.В., Чеботарева Т.А., Баландина М.В., Смагина М.А., Непоклонова И.В., Алипер Т.И. Разработка и совершенствование иммуноферментных тест-систем на основе моноклональных антител, предназначенных для диагностики инфекционных болезней животных. Ветеринарная патология. 2003; 1(5): 107–109.
5. Верховский. О.А., Алипер Т.И. Иммуноферментный метод диагностики лейкоза крупного рогатого скота // «Лейкоз крупного рогатого скота». Под ред. В.А. Апалькин, М.И Гулюкин, Н.И Петров. С.-Петербург: Петролазер. 2005; 106.
6. Верховский О.А., Цибезов В.В., Баландина М.В., Непоклонова И.В. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария. 2002; 12: 8–10.
7. Иванов О.В., Иванова О.Ю., Федотов В.П., Брезгина Т.И., Монова Н.Г., Баландина М.В., Верховский О.А. Эффективность серологических методов исследования при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринария. 2008; 7: 6–8.
8. Иванов О.В., Иванова О.Ю., Федотов В.П., Баландина М.В., Верховский О.А., Федоров Ю.Н. Возрастная динамика содержания антител к вирусу лейкоза у телят, рожденных от серопозитивных коров. Сельскохозяйственная биология. 2008; 6: 87–90.
9. Иванов О.В., Федотов В.П., Крючкова Е.Н., Брезгина Т.И., Верховский О.А. Об эффективности серодиагностики лейкоза коров при trematodозной инвазии. Сельскохозяйственная биология. 2009; 2: 111–113.
10. Иванов О.В., Верховская А.Е., Иванова О.Ю., Федотов В.П., Федоров Ю.Н., Верховский О.А. Влияние вакцинации на иммунологическую реактивность и эффективность серологической диагностики лейкоза у телят. Ветеринарный врач. 2009; 1: 23–25.
11. Маврин Н.А. Подкожный овод крупного рогатого скота в Западном регионе Российской Федерации: био-

- логия, меры борьбы: дис. ... канд. биол. наук. ВНИИВСГЭ. М., 2008.
12. Савицкая О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота. Дис. ... канд. вет. наук. ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. М., 2004.
13. Тарасов И.Е., Костина Л.В., Цибезов В.В., Козлов А.Ю., Непоклонов А.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. ИФА для определения ивермектина с использованием моноклональных антител. Ветеринария. 2009; 4: 59–61.
14. Федоров Ю.Н., Верховский О.А., Феоктистова Т.А. Моноклональные антитела — новый путь в иммунодиагностике и иммунопрофилактике инфекционных болезней животных. Сельскохозяйственная биология. 1990; 2: 22–38.
15. Хитрова А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. Эффективность применения комбинированных вакцин серии КОМБОВАК. Ветеринария. 2006; 9: 17–20.
16. Храмцов В.В., Рудницкий В.Ф., Двоеглазов Н.Г., Магер С.Н., Смирнов П.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И. и др. Иммуноферментный анализ при диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота. Методические рекомендации СО Россельхозакадемии. Новосибирск. 2008.
17. Шемельков Е.В., Котельников А.П., Куликова Т.С., Мишин А.М., Верховский О.А., Алипер Т.И. Разработка и оценка эффективности живой маркированной вакцины «ВЕР-РЕС-БАгЕ-» против болезни Ауески. Ветеринария. 2018; 6: 21–27.
18. Vordermeier M., Goodchild A., Clifton-Hadley R., de la Rue R. et al. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. Vet. Rec. 2004; 155(2): 37–38.
19. Wolfram J.H., Kokanov S.K., Verkhovsky O.A. Diagnostic and vaccine chapter. Vaccine. 2010; 28(5): F49–F53.
20. World Organization of Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2019. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/> access-online.

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Гребенникова Т.В.

Молекулярные методы анализа — методы анализа нуклеиновых кислот открыты сравнительно недавно и применяются как методы диагностики генетического материала как в образцах от животных и человека, так и в образцах окружающей среды. В ветеринарии их используют в основном для выявления патогена, редко для контроля эффективности лечения и контроля вакцинных препаратов, прежде всего живых вакцин. Молекулярные методы анализа — это полимеразная цепная реакция и ее различные модификации, полимеразная реакция в реальном времени, биочипы и секвенирование.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Метод ПЦР позволяет определять малые и сверхмалые количества нуклеиновых кислот путем прямого обнаружения инфекционного агента как вирусной, так и бактериальной природы. Методом ПЦР можно определить любое изменение в генетическом материале, даже единичную генетическую мутацию.

Метод ПЦР был открыт в 1984 г. американским биохимиком К. Мюллисом,

который впервые показал возможность амплификации (многократного увеличения числа копий) участков ДНК в пробирке в процессе реакции [22]. В 1993 г. за открытие метода ПЦР К. Мюллис был награжден Нобелевской премией.

Синтез копий молекул ДНК *in vivo* (полимеразная реакция) происходит во всех организмах во время клеточного деления. Копирование ДНК осуществляют ферменты (ДНК-полимеразы).

ПЦР — это получение множества копий специфического фрагмента ДНК в пробирке (*in vitro*).

В настоящее время ПЦР широко используется в различных областях — как в научных исследованиях, так и в клинической ветеринарной практике.

Проведение ПЦР на матрице ДНК. Метод ПЦР основан на 3-этапном циклическом процессе, в результате которого многократно увеличивается количество специфического фрагмента ДНК. Рассмотрим механизм протекания ПЦР. Каждый цикл ПЦР состоит из трех стадий или трех шагов: денатурации (94–95°C), отжига (гибридизации)

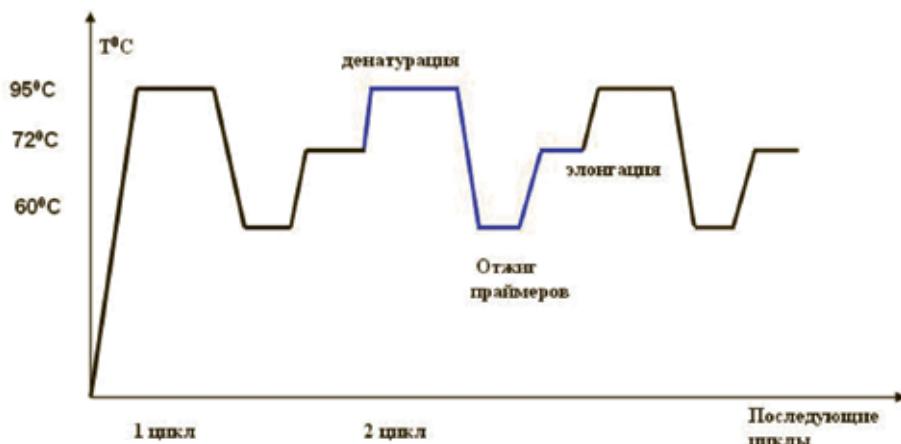


Рис. 1. Изменение температуры на различных стадиях ПЦР

праймеров ( $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ ), полимеризации или элонгации (удлинения) цепи ДНК ( $72^{\circ}\text{C}$ ). Схематически изменение температуры можно представить на рис. 1.

**Денатурация.** Во время денатурации под действием высокой температуры ( $94\text{--}95^{\circ}\text{C}$ ) происходит «расплавление» двуцепочечной ДНК, то есть цепи ДНК разделяются и ДНК переходит в одннитевую форму. Таким образом освобождается место для «посадки» или гибридизации праймеров.

**Отжиг (гибридизация) праймеров.** При понижении температуры до «температуры отжига» —  $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$  специфические одноцепочечные участки ДНК (праймеры) гибридизуются с комплементарным участком матрицы (исходной, расплавленной ДНК), то есть образуют двунитевую ДНК. Праймеры синтезируются химическим путем и ограничивают исследуемый специфический участок ДНК. В молекулярной биологии гибридизацию праймеров на специфическом участке ДНК называют «отжигом». Каждый праймер гибридизуется на двух цепях ДНК таким образом, что 3'-гидроксильные концы праймеров, которые способны удлиняться, направлены навстречу друг другу. После гибридизации праймеры строго ограничивают специфический участок ДНК.

Праймеры подбираются с помощью компьютерных программ. Основным критерием подбора праймеров является комплементарность матрице, особенно важна полная комплементарность 2–3 нуклеотидов на 3'-конце праймеров [29]. Важным фактором, влияющим на эффективность и специфичность амплификации, является подбор оптимальной температуры «отжига» праймеров на матрице. Данная температура зависит от длины праймеров и их СG-состава. Для олигонуклеотидов длиной 14–70 оснований используется эмпирическая формула, позволяющая

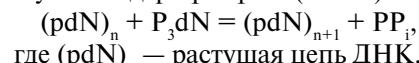
рассчитать оптимальную температуру «отжига» праймеров:

$$T \text{ } (\text{°C}) = 4(G+C) + 2(A+T) - 3,$$

где А, Т, Г, С — число соответствующих нуклеотидов в одном праймере.

**Полимеризация или элонгация.** При повышении температуры до  $72^{\circ}\text{C}$  создаются оптимальные условия для эффективной работы термостабильной ДНК-полимеразы. В процессе элонгации происходит реакция, осуществляемая термостабильной ДНК-полимеразой [25]. ДНК-полимераза связывается с участком ДНК, в котором одна из цепей непрерывна (матрица), а другая заканчивается 3'-концом и содержит 3'-гидроксил, необходимый для продолжения цепи (праймер). После этого фермент в комплексе с матрицей и праймером связывает соответствующий следующему нуклеотидному звену матрицы субстрат и катализирует реакцию его присоединения (рис. 2).

Химическая реакция, обеспечивающая данный процесс, заключается в конденсации растущей цепи ДНК с очередным субстратом. Субстратом полимеразной реакции являются 4 дезоксинуклеотидтрифосфата (dNTP).



$P_i dN$  — dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфат),

$(pdN)_{n+1}$  — цепь ДНК, удлиненная на один нуклеотид,

$PP_i$  — пироfosфат.

Доказательство этой химической схемы, а также выделение первой ДНК-полимеразы осуществил А. Корнберг с сотрудниками.

Следующий цикл реакции начинается денатурацией полученной ДНК. В этом случае получается в два раза больше молекул, на которых будут гибридизоваться праймеры. Серия повторяющихся циклов позволяет получить экспоненциальное накопление фрагмента ДНК. В идеальном случае наработка специ-

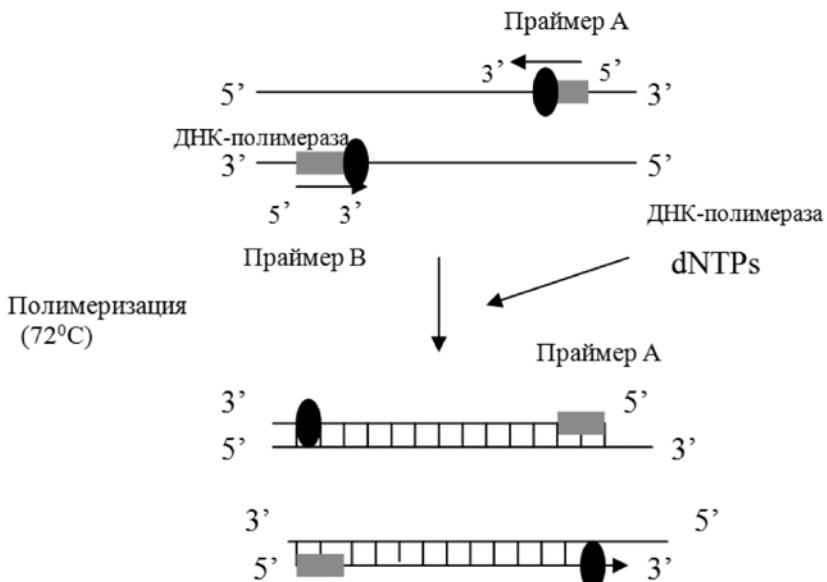


Рис. 2. Схема полимеризации при ПЦР

фического фрагмента подчиняется закону  $2^n - 2n$  раз, где  $n$  — число циклов, а  $2n$  — продукт неопределенной длины, полученный в каждом цикле с исходной матрицы ДНК. После проведения 25–30 циклов происходит увеличение фрагмента в  $10^6$ – $10^8$  раз (рис. 3).

Длина фрагмента, нарабатывающегося в ПЦР, равна сумме длин двух праймеров плюс расстояние на ДНК-матрице между праймерами.

Термостабильные ДНК-полимеразы. Термостабильные ферменты выделяют из термофильных бактерий, температурный оптимум для полимеризации  $72$ – $84^\circ\text{C}$ . Точно не установлено, к какому типу полимераз относятся термостабильные ДНК-полимеразы. Это белки, по молекулярной массе приближающиеся к  $80$ – $90$  кДа. По этой характеристике данные ферменты приближаются к ДНК-полимеразам I типа или к ДНК-полимеразам альфа-типа. Термостабильные ферменты в большинстве своём обладают 5'–3'экзонуклеазной активностью. Считают, что первая термостабильная ДНК-полимераза была выделена из штамма термофильной бактерии *Thermus aquaticus* YT1 (Таq ДНК-полимераза) [20]. Однако мало кто знает, что в 1980 г. термостабильная ДНК-полимераза была описана и выделена в России С. Городецким [17].

В амплификации наиболее часто используются Таq ДНК-полимераза и Tth ДНК-полимераза [8]. В настоящем используют множество термостабильных ДНК-полимераз, которые имеют различные свойства [29].

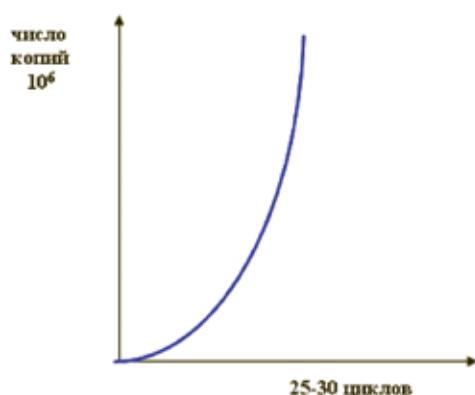


Рис. 3. График увеличения количества копий матрицы в ходе ПЦР

**Проведение ОТ-ПЦР на матрице РНК.** Метод ОТ-ПЦР — это модификация метода ПЦР. ОТ-ПЦР используют для выявления молекул РНК. Метод возник как последовательное проведение двух реакций. В ходе первой стадии — обратной транскрипции с помощью одного праймера, комплементарного исследуемой РНК, субстратов реакции (dNTPs) и матрицы РНК происходит ферментативный синтез копий ДНК (кДНК) с матрицы РНК. Вторая стадия — это классическая ПЦР, которую мы подробно описали ранее [28].

Первую стадию проводят с использованием мезофильной ревертазы (фермента, синтезирующего кДНК на матрице РНК).

Существенной проблемой использования РНК в качестве матрицы является наличие сложной вторичной структуры молекул РНК. Некоторые исследователи используют вещества, дестабилизирующие молекулу РНК: метилртуть или диметилсульфоксид (DMSO). Однако добавление таких веществ может снизить эффективность синтеза и амплификации кДНК. Другой подход — повышение температуры обратной транскрипции выше 42°C, следовательно, использование термостабильных ферментов [10].

ОТ-ПЦР можно проводить как в различных пробирках (в две стадии), так и в одной пробирке (совмещенную ОТ-ПЦР) без существенной потери чувствительности.

ПЦР и ОТ-ПЦР проводят в приборах, называемых амплификаторами или термоциклерами. В настоящее время существует множество моделей как отечественного, так и зарубежного производства.

Детекция результатов ПЦР или ОТ/ПЦР. Существует несколько способов детекции (или просмотра) результатов ПЦР. Самым простым и удобным ме-

тодом является электрофорез. Электрофорез проводится в агарозном или полиакриламидном гелях, содержащих бромистый этидий (химический агент, который связывается с двойной цепью ДНК и светится под действием ультрафиолетового света). Иногда вместо бромистого этидия гель окрашивают ионами серебра [11]. После проведения ПЦР продукты реакции могут быть дополнительно обработаны рестрикционными эндонуклеазами (ферментами, разрезающими ДНК в строго определенных местах) и анализированы методом электрофореза. Такой метод часто используется авторами работ по генетике.

Иногда в ПЦР используют биотинилированные праймеры. Меченные биотином ПЦР-продукты переносят на твердый носитель (мембрану), к ней добавляют avidin-пероксидазный комплекс. Затем проводят цветную пероксидазную реакцию с субстратом. Количество амплификата определяют по интенсивности цветной реакции. Такой метод аналогичен детекции при постановке иммуноферментного анализа. Праймеры можно модифицировать, используя различные флуоресцентные красители. Тогда после проведения ПЦР продукты реакции можно анализировать с использованием флуориметрии. Результаты ПЦР можно также контролировать колориметрированием [18]. Широко применяется подход, основанный на молекулярной гибридизации. В этом случае применяют специфические химически модифицированные праймеры или зонды (см. ПЦР в реальном времени).

**Модификации ПЦР.** «Гнездовая» (*“nested”*) ПЦР используется для детекции ДНК в следовых количествах (1–100 копий на пробу). Праймеры для «гнездовой» ПЦР подбираются таким образом, чтобы места гибридизации праймеров для второй ПЦР находились внутри участка ДНК, ограниченного

праймерами для первой ПЦР. Таким образом, специфический продукт первой ПЦР может служить матрицей во второй ПЦР, а неспецифические продукты, если они образуются в течение первой реакции, выступать в роли матрицы во второй ПЦР не могут. «Гнездовая ПЦР» требует для выполнения анализа несколько большего времени, но позволяет добиться повышения чувствительности и специфичности анализа.

*ПЦР с горячим стартом (“Hot start” PCR)* применяется для уменьшения неспецифического праймирования в ходе приготовления реакционной смеси при комнатной температуре. Один из компонентов реакции добавляют к реакционной смеси только после нагревания до 95°C, либо создают между компонентами механическую преграду (восковую мембрану). После нагревания до 95°C мембрана расплывается, компоненты смешиваются и начинается реакция. Альтернативой является использование модифицированных полимераз или моноклональных антител к ДНК-полимеразе. При этом существенного повышения специфичности не происходит, а выход продукта может быть несколько повышен.

*ПЦР с плавным снижением температуры отжига (“Touch down” PCR)* проводят таким образом, что в первых циклах температура отжига праймеров несколько превышает расчетную, снижая вероятность неспецифического связывания праймеров. Обогащение реакционной смеси специфической матрицей позволяет в последующих циклах снизить температуру отжига на 2–4°C и получить значительное количество конечного продукта ПЦР.

*Градиентная ПЦР (“Gradient” PCR)* представляет собой модификацию предыдущей методики, в которой создается линейный градиент температуры отжига с использованием термоциклира.

*Протяженная ПЦР (“Long” PCR)* применяется для амплификации протяженных участков ДНК (более 5000 пар оснований). Обычно используют смесь ДНК-полимераз или ДНК-полимеразу с особыми свойствами, в реакционную смесь добавляют дополнительные специфические компоненты. Также существенно увеличивается время элонгации.

*ПЦР непосредственно в ткани, в клетке (“In situ” PCR)* позволяет изучать процессы внутриклеточного размножения и развития вирусов. Выявление продукта обычно проводится методом гибридизации, при этом маркер, связывающий флуоресцентный краситель в ходе анализа, входит в состав праймеров.

*ПЦР от одной клетки (“Singl-cell” PCR)* исследует материал, полученный от одной клетки методами микроманипуляций. Применяется в экспериментах по генетике человека и животных, в пренатальной диагностике.

Компоненты реакционной смеси.

Реакционная смесь для ПЦР состоит из следующих компонентов, которые обязательно должны быть добавлены в пробирку:

- 1) термостабильного фермента ДНК-полимеразы,
- 2) двух олигонуклеотидных праймеров (обычно 20 нуклеотидов длиной), подобранных на специфический участок ДНК, который необходимо копировать,
- 3) четырех дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (dNTPs),
- 4) ДНК или РНК, выделенных из клинического образца,
- 5) набора солей определенной кислотности (буферная система), в которой ДНК-полимераза эффективно работает. Обязательно содержит ионы Mg<sup>2+</sup>.

Как показали исследования, состав реакционной смеси необходимо подбирать в каждом конкретном случае

[29]. Ионный состав и рН реакционного буфера необходимо подбирать так, чтобы активность термостабильной ДНК-полимеразы, используемой в реакции, была максимальной [9]. Значение рН для различных термостабильных ДНК-полимераз должно находиться в интервале 8,2–8,9, значение ионной силы — 0,01–0,08. Обычно используют 0,04–0,25 мМ концентрацию каждого dNTP. Увеличение концентрации dNTP до 1–1,2 мМ снижает активность фермента на 30%. Концентрация ионов  $Mg^{2+}$  оказывает существенное влияние на активность термостабильных ДНК-полимераз. Наличие в ДНК-матрице примесей хелатирующих агентов может привести к снижению концентрации свободных ионов  $Mg^{2+}$  и тем самым к снижению эффективности ПЦР. При суммарной концентрации dNTPs 0,7–0,8 мМ оптимальная концентрация этого иона 1,5–2 мМ, повышение концентрации ионов  $Mg^{2+}$  до 10 мМ снижает активность Таq ДНК-полимеразы на 50%. Необходимо отметить, что при проведении реакции обратной транскрипции можно использовать в качестве двухвалентного иона как  $Mg^{2+}$ , так и  $Mn^{2+}$  [12]. Обычно применяемая концентрация праймеров — 0,3–1 мкМ. Высокая концентрация праймеров может приводить к образованию «праймерных димеров». Для стабилизации фермента некоторые исследователи рекомендуют использовать 10% диметилсульфоксид (DMSO). Однако высокие концентрации DMSO (больше 10%) могут снижать активность Таq ДНК-полимеразы почти на 50%. Для повышения эффективности гибридизации ДНК (РНК) и праймера можно использовать тетраметиламмонийхлорид (TMAK), при этом ингибирование ДНК-полимеразы не наблюдается.

#### *Преимущества метода ПЦР:*

- чувствительность (до нескольких копий генома или 10–15 г ДНК в пробе);
- специфичность;
- возможность дифференциальной диагностики различных ДНК и РНК;
- возможность быстрой диагностики.

**ПЦР в реальном времени.** Одним из самых современных вариантов ПЦР является ПЦР в реальном времени [15]. Название отражает общий смысл новой модификации. ПЦР в реальном времени основана на количественной детекции флуоресцентного сигнала, который увеличивается пропорционально количеству ПЦР-продукта. Следовательно, результат ПЦР в реальном времени можно регистрировать в процессе реакции в каждый момент времени.

В процессе проведения ПЦР в реальном времени используются т.н. TagMan зонды. Это короткие одноцепочечные ДНК размером 17–10 нуклеотидов, синтезированные химическим путем. Современная тест-система ПЦР в реальном времени содержит не только пару праймеров, а и дополнительный TagMan зонд, комплементарный внутреннему участку фрагмента. К зонду ковалентно пришиты два химических соединения или две молекулы: на 5'-конце флуоресцентная метка (т.н. reporter), она испускает флуоресценцию, на 3'-конце присоединен гаситель флуоресценции (quencher), который гасит флуоресценцию флуоресцирующей молекулы. Когда Таq ДНК-полимераза продвигается по одноцепочечной матрице, то, достигнув зонда, расщепляет его. При этом расстояние между флуоресцентной меткой и гасителем флуоресценции увеличивается, флуоресценция больше не гасится. Регистрируя интенсивность свечения, исследователь может узнать о ходе реакции без дополнительной стадии — электрофореза (*рис. 4*).

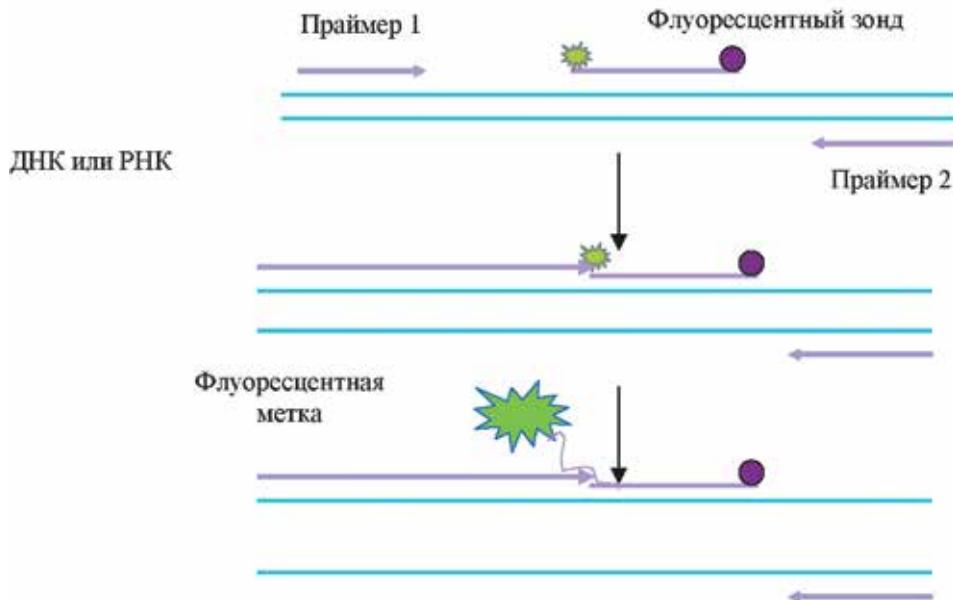


Рис. 4 . Схема проведения ПЦР в реальном времени с использованием TagMan зонда

ПЦР в реальном времени проводят в специальных приборах. Прибор представляет собой амплификатор, совмещенный с флюориметром. В процессе ПЦР происходит считывание результатов амплификации. Применение ПЦР в реальном времени дает возможность проводить количественные исследования микроорганизмов. Кроме того, используя различные красители, можно проводить определение нескольких нуклеиновых кислот в одной пробе [26].

#### **Преимущества ПЦР в реальном времени**

1. Информацию о составе пробы и о ходе реакции можно получить, не открывая пробирку. Это ускоряет получение результата, снижает опасность контаминации.

2. Наличие специфического зонда, комплементарного внутреннему участку фрагмента, дополнительно проверяет специфичность полученного фрагмента, снижает риск получения ложноположительных результатов.

3. Регистрация интенсивности флюресценции позволяет судить о количестве в пробе исходной нуклеиновой кислоты.

4. Возможность проводить т.н. множественную ПЦР, т.е. регистрировать в одной реакции несколько ДНК, используя различные флуоресцентные красители.

Необходимо отметить разницу в детекции конечного продукта после проведения ПЦР (в агарозном геле) и при проведении ПЦР в реальном времени (рис. 5). В агарозном геле определяют результаты, полученные в конечной точке реакции, что занимает достаточно много времени. Результаты основаны на определении различий в размерах ДНК-фрагментов положительного контроля и проб, что может быть неточным.

Например, если в образцах содержится 10 копий и 50 копий ДНК-фрагмента, визуально на агарозном геле трудно определить различие между 5-кратным изменением концентрации. В случае

ПЦР в реальном времени можно обнаружить двукратную разницу концентрации (т.е. 10 и 20 копий ДНК-фрагментов).

В настоящее время появляется также все больше отечественных тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для определения различных ДНК и РНК [5, 1]. Нет сомнения, что ПЦР в реальном времени получит дальнейшее развитие в будущем.

**Биочипы.** Биологические микрочипы (biochips), или, как их чаще называют, DNA microarrays, — это один из новейших инструментов биологии и ветеринарии XXI века. С использованием микрочипов можно проводить одновременный анализ работы тысяч и десятков тысяч генов, сравнивать их экспрессию. Кроме того, можно исследовать одновременно множество белковых молекул. Такие исследования помогают создавать новые лекарственные препараты, выяснять, на какие гены и каким образом эти новые лекарства действуют. Биочипы являются также незаменимым инструментом для биологических исследований, за один эксперимент можно увидеть влияние различных факторов (лекарств, белков, питания) на работу десятков тысяч генов.

Биочипы позволяют очень быстро определять не только наличие нуклеиновых кислот вирусных и бактериальных возбудителей, но и контролировать геномные изменения, являющиеся маркерами устойчивости к лекарственным препаратам [13].

Прообразом современных «живых чипов» послужил саузерн-блот, изготовленный в 1975 году Эдом Саузерном. Он использовал меченую нуклеиновую кислоту для определения специфической последовательности среди фрагментов ДНК, зафиксированных на твердой подложке. В России учёные начали активно разрабатывать биочипы в конце 1980-х годов в Институте молекулярной биологии под руководством А.Д. Мирзабекова.

Точнее всего биочипы описывает английское название DNA-microarrays, т.е. это организованное размещение молекул ДНК на специальном носителе — «платформе». Платформа — это чаще всего пластиинка из стекла или пластика (иногда используют и другие материалы, например кремний), на которую наносятся биологические макромолекулы (ДНК, белки, ферменты), способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе.

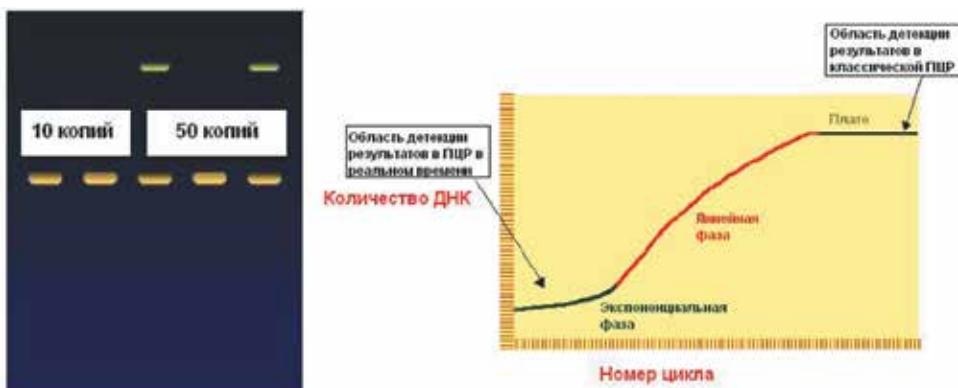


Рис. 5. Сравнение детекции продуктов реакции при проведении ПЦР и ПЦР в реальном времени

В зависимости от того, какие макромолекулы используются, выделяют различные виды биочипов, ориентированные на разные цели. Основная доля производимых в настоящее время биочипов приходится на ДНК-чипы (94 процента), то есть матрицы, несущие молекулы ДНК. Оставшиеся 6 процентов составляют белковые чипы [13].

Организованное размещение макромолекул занимает на платформе очень небольшой участок размером от почтовой марки до визитной карточки. Микроскопический размер биочипа позволяет размещать на небольшой площади огромное количество разных молекул ДНК и считывать с этой площади информацию с помощью флуоресцентного микроскопа или специального лазерного устройства для чтения (*рис. 6*). Размеры ячеек современных микрочипов лежат в пределах ~50–200 микрон, общее число ячеек на чипе составляет  $10^3$ – $10^5$ , а линейные размеры чипа ~1 см. В поверхностных матричных биочипах ДНК

иммобилизируется на поверхности мембран или пластинон из стекла, пластика, полупроводника или металла. В гелевых биочипах ДНК иммобилизируется в слое полиакриламидного геля толщиной 10–20 микрон, нанесенного на специально обработанную поверхность стекла. Так же чипы могут наращиваться прямо из стеклянной пластины методом фотолитографии с использованием специальных микромасок.

Иммобилизируемая ДНК наносится на поверхность или через игольчатые растры (пины) механического робота или с помощью технологии струйного принтера. Контроль качества нанесения осуществляется с помощью специализированной оптики и компьютерного анализа изображения. На биочипе в дальнейшем гибридизуют молекулы ДНК, меченные красителем.

Гибридизуемая ДНК в растворе метится с помощью флуоресцентной или радиоактивной метки. Для смеси молекул ДНК (например ДНК дикого типа

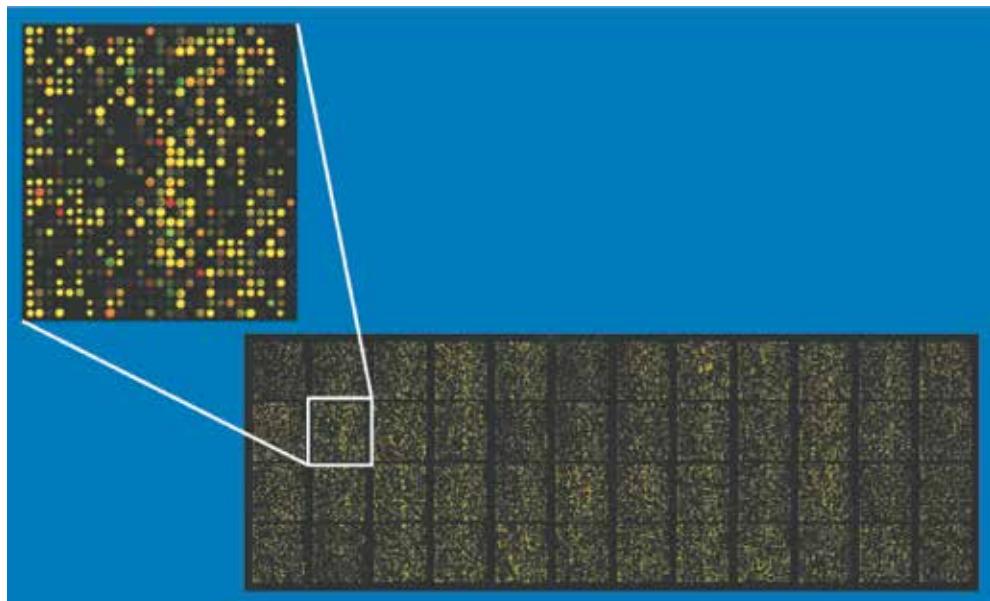


Рис. 6. Схема матричного биочипа с иммобилизованной ДНК

и ДНК с мутациями) каждая метится своим флуоресцентным красителем. Свойства красителя не должны сильно зависеть от состава (A/T или G/C) ДНК и температуры.

Интенсивность флуоресценции в ячейках измеряют с помощью сканера или люминесцентного микроскопа, передающего сигнал на прибор с зарядовой связью. Однако флуоресценция является основным, но не единственным методом изучения гибридизации. В частности, данные о характере гибридизации можно получить также с помощью масс-спектрометрии, атомной силовой микроскопии и др.

В основе принципа работы всех типов биочипов с иммобилизированной ДНК лежит точное соответствие между комплементарными ДНК по правилу Уотсона–Крика, A-T, G-C. Если соответствие между нуклеотидами иммобилизированной и гибридизуемой ДНК точно удовлетворяет условиям комплементарности, то образующиеся дуплексы будут термодинамически наиболее устойчивы. В результате при конечных температурах их будет больше, чем несовершенных дуплексов с нарушением условий комплементарности, и соответственно совершенным дуплексам будет отвечать более сильный сигнал флуоресценции. В выявлении и сопоставлении наиболее ярко светящихся ячеек и заключается работа прибора-анализатора биочипов.

Гибридизуемая ДНК обычно заранее нарабатывается с помощью ПЦР. В более продвинутых технологиях ПЦР осуществляется непосредственно на чипе. Кроме этого, непосредственно на чипе можно осуществлять фрагментацию, фосфорилирование, лигирование ДНК или минисеквенирование, при котором длина дуплекса увеличивается на одну пару оснований. Последнюю технику можно эффективно использовать для поиска мутаций.

На Западе и в России сейчас сформировалось два разных направления и два разных стандарта по созданию и применению биочипов. Российские биочипы дешевле, а западные объемнее. При этом в России биочипами занимаются пока преимущественно исследовательские лаборатории, а на Западе это в первую очередь военные исследования и коммерческое производство чипов для диагностики [19]. В настоящее время кроме диагностических все чаще разрабатываются микрочипы для контроля чувствительности вирусов и бактерий к лекарственным препаратам.

**Секвенирование.** Секвенирование — это получение данных о нуклеотидной последовательности генома. Первоначальная структура является наиболее полной молекулярно-биологической характеристикой организма и позволяет точно идентифицировать исследуемый микроорганизм (вирус, бактерию, гриб), растение, животное и даже человека. С помощью секвенирования можно проанализировать степень родства с другими подобными организмами, а также отличить практически идентичные виды, штаммы, линии и т.д. Таким образом, именно с использованием секвенирования можно осуществить контроль качества живых вакцин. В настоящее время для многих вирусов возможно воссоздание исходного штамма de novo, имея в распоряжении полную нуклеотидную последовательность генома. При этом полученный штамм ничем не будет отличаться от родителя, для которого были получены данные о полной нуклеотидной последовательности генома. Таким образом, имея данные о полной нуклеотидной последовательности генома организма, исследователь способен определить его абсолютную идентичность или отличия, даже минимальные, от других организмов, а в случаях вирусов — и воссоздать исходный.

Определение полной нуклеотидной последовательности вирусных геномов становится все более востребованным и популярным методом для наиболее полной молекулярно-биологической характеристики микроорганизмов в связи с широким распространением автоматических секвенаторов, появлением ПЦР и, как следствие, снижением материальных и временных затрат на получение этих данных.

В 1977 г. были предложены два метода секвенирования. Первый метод, основанный на химической деградации ДНК с последующим анализом длины ДНК-фрагментов, называемый также по имени авторов методом Максами—Гилберта [21], в настоящее время используется крайне редко. Второй метод (метод Сэнгера) [27], называемый методом терминации цепи, использует свойство ДНК-полимеразы прекращать синтез полимеризуемой цепи при встраивании в нее дидезоксирибонуклеотидов. Принцип метода состоит в использовании двух основных положений. Первое: если к ДНК-матрице добавить специфичный праймер, dNTPs, ДНК-полимеразу и проводить реакцию в подходящих солевых и температурных условиях, то все синтезирующиеся *de novo* цепи ДНК будут начинаться с одинаковой стартовой точки. Второе: если в такую смесь добавить какои-либо (из четырех возможных) ddNTP, например ddATP, то все растущие цепи будут специфически терминироваться после вставления ddATP. В результате продукты реакции будут представлять собой набор одноцепочечных ДНК, начинающихся от одной точки и заканчивающихся на ddATP. Аналогично можно провести реакцию с терминированием цепи по трем другим нуклеотидам. Для идентификации данных, полученных таким способом, необходимо провести электрофоретическое

разделение таких смесей фрагментов в условиях, позволяющих отличать сигналы индивидуальных фрагментов, отличающихся по длине на один нуклеотидный остаток.

Определение первичной структуры генов различных микроорганизмов — это первый шаг к конструированию новых лекарственных препаратов направленного действия. Секвенирование широко используется для определения маркерных мутаций при контроле устойчивости вирусов и бактерий к лекарственным препаратам.

### *Стандартизация и контроль качества диагностических тест-систем*

Несмотря на быстрое развитие метода ПЦР в нашей стране, система стандартизации требует доработки. Метод ПЦР в настоящее время не представлен и в отечественной фармакопее.

Метод амплификации нуклеиновых кислот как общая фармацевтическая статья впервые включен в Европейскую фармакопею (ЕФ) в 2001 г. В действующей ЕФ 2010 года издания данная статья расширена и дополнена. В главе 3, посвященной методам, описываются возможности метода ПЦР, его основы, используемые материалы, методика проведения анализа, а также получение и интерпретация результатов. В статье представлены разделы, определяющие возможности метода ПЦР, основы метода, используемый для анализа материал, методика проведения анализа, получение и интерпретация результатов, различные модификации ПЦР [14].

Особые требования в ЕФ отмечены при постановке ПЦР:

1. В связи с высокой чувствительностью метода ПЦР пробы должны быть оптимально защищены от контаминации фрагментами ДНК. Пробоподготовка, хранение и транспортировка

образцов должна проводиться в условиях, минимизирующих деградацию нуклеиновой кислоты. В случае использования в качестве мишени РНК необходимы дополнительные способы предотвращения деградации РНК, так как она подвержена деструкции под действием рибонуклеаз. Особое внимание должно уделяться используемым реагентам, таким как антикоагулянты и консерванты, которые взаимодействуют с компонентами реакционной смеси.

2. Риск контаминации требует строгого разделения пространств, в которых происходит обработка материала и реакция амплификации. Основными объектами внимания являются: поведение персонала, одежда, поток материала и процедура деконтаминации.

Пространство должно быть разделено на отделы, такие как:

- отдел, в котором происходит подготовка реакционной смеси (праймеры, буфер) и не содержится нуклеиновых кислот;
- отдел пробоподготовки (отдел, в котором содержатся реагенты, пробы и контрольные образцы),
- отдел для ПЦР (амплификация продукта происходит в закрытой пробирке),
- пост-ПЦР-пространство (единственный отдел, в котором амплифицированный материал находится в открытой системе).

3. Во время пробоподготовки амплифицируемая последовательность должна быть максимально полно экстрагирована или выделена из исследуемого материала с использованием воспроизводимого метода и таким способом, чтобы амплификация с использованием выбранных условий реакции была бы возможной. Могут быть использованы различные физико-химические способы экстракции.

Примеси, присутствующие в исследуемом материале, могут взаимодействовать с компонентами реакции.

В случае амплификации РНК необходимо предотвратить действие рибонуклеазы.

4. ПЦР амплификация последовательности мишени проводится при определенных условиях: температурных режимах денатурации двухцепочечной ДНК, присоединения праймеров, удлинения праймеров; времени инкубации при выбранных температурных режимах; температурных скачков. Эти условия зависят от следующих параметров: длины и состава праймеров и последовательности мишени; типа ДНК-полимеразы, состава буфера и объема реакционной смеси; типа термоциклира, степени контакта между прибором, пробиркой и реакционной смесью.

5. Ампликон, полученный в результате ПЦР, может быть идентифицирован в соответствии с его размером, последовательностью, химической модификацией или комбинацией этих параметров. Характеристика размера фрагмента может быть выявлена при проведении гель-электрофореза (с использованием агарозного или поликариламидного геля или капиллярного электрофореза) или колоночной хроматографии (например HPLC). Характеристика ампликона с использованием анализа сиквенса может быть получена с использованием специфической гибридизацией проб, имеющих последовательности, комплементарные мишени, или отщеплением амплифицированного материала, отражающего мишень-специфичные рестрикционно-энзимные сайты. Характеристика с использованием химической модификации может быть получена, например, введением флуорофора в ампликон и последовательной детекцией флуоресценции в результате возбуждения.

Детекция ампликонов может быть также проведена с использованием связанных зондов с последующей радиоизотопной или иммуноферментной детекцией.

Особенное внимание ЕФ уделяет интерпретации результатов. Результаты являются достоверными, если положительные контроли без сомнения являются положительными, а отрицательные контроли без сомнения являются отрицательными. Благодаря очень высокой чувствительности ПЦР и высокому риску контаминации необходимо подтверждать положительные результаты, проводя исследования дважды с разными аликвотами одной пробы. Проба является положительной, если по крайней мере один из тестов дал положительный результат.

Для валидации тест-системы на основе ПЦР необходимо соответствие официального рабочего стандарта или внутреннего стандарта международным стандартам.

Во время валидации должно быть определено отсекающее значение. Положительное отсекающее значение определяется как минимальное количество мишени на единицу объема, которое может быть определено в 95% случаев. Положительное отсекающее значение зависит от объема экстрагирующей пробы, методики экстракции, эффективности транскрипции на матрице РНК, амплификации и способов детекции результатов.

Для определения предела обнаружения системы стандарт должен давать отсекающее значение для каждого образца, а тест значения — больше и меньше положительного отсекающего значения.

Строго регламентирован в ЕФ и контроль реагентов. Все реагенты, необходимые для проведения реакции, должны контролироваться даже в случаях рутинных исследований. Их пригод-

ность/непригодность зависит от определенных критериев качества.

Праймеры являются необходимыми компонентами ПЦР анализа, а дизайн праймеров, чистота и валидация их использования в ПЦР анализе требует особого внимания. Каждая новая партия праймеров перед использованием тестируется на специфичность, эффективность амплификации, наличие ингибиторов. Праймеры могут быть модифицированными (например связаны с флуорофором или антигеном) для обеспечения специфичности детекции ампликона или иметь другую модификацию, которая не снижает точности и эффективности амплификации.

В целях минимизации риска контаминации и уверенности в адекватной чувствительности в каждой тест-системе присутствует внешний контроль:

- положительный контроль: содержит определенное количество копий мишени, количество определяется индивидуально для каждой пробы в результате многочисленных положительных отсекающих значений тест-системы;

- отрицательный контроль: проба, содержащая полный набор реагентов, но свободная от матрицы.

Внутренний контроль — это определенная нуклеиновая кислота, имеющая участки для связывания праймеров. Внутренний контроль должен амплифицироваться с той же эффективностью, что и исследуемая мишень, однако ампликоны должны быть различимы. Внутренний контроль должен являться тем же типом нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК), что и тестируемая мишень. Внутренний контроль желательно добавлять в исследуемый материал перед выделением нуклеиновой кислоты.

Участие независимых экспертов для оценки качества проводимых тестов является важным моментом для каждой лаборатории и каждого оператора.

В настоящее время в России для регистрации тест-систем в обязательном порядке разрабатываются проекты ФСП (для регистрации в Минздраве) и СТО (для регистрации в Министерстве сельского хозяйства). ФСП и СТО включают разделы, отражающие требования, представленные как в Европейской фармакопее, так и в отечественных ГОСТах. Разработка ФСП и СТО являются первым этапом стандартизации тест-систем на основе молекулярных и иммунологических методик.

В качестве применения ПЦР в фармацевтической и медицинской химии, при разработке вакцин приведем несколько примеров.

Согласно 5.2.2 главе Европейской фармакопеи [14], необходимо соблюдать условия содержания SPF-птиц для получения SPF-эмбрионов при производстве медицинских вакцин с использованием куриных эмбрионов. Для этого определен список вирусов (*Avian adenoviruses*, group 1, *Avian encephalomyelitis virus*, *Avian infectious bronchitis virus*, *Avian infectious laryngotracheitis virus*, *Avian leucosis viruses*, *Avian nephritis virus*, *Avian orthoreoviruses*, *Avian reticuloendotheliosis virus*, *Chicken anaemia virus*, *Egg drop syndrome virus*, *Infectious bursal disease virus* Serotype 1, Serotype 2, *Influenza A virus*, *Marek's disease virus*, *Newcastle disease virus*, *Turkey rhinotracheitis virus*) и бактерий (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Salmonella pullorum*), которые необходимо контролировать. Контроль обычно осуществляется методом ИФА (если определяют антитела кенным патогенам) или ПЦР (если определяют непосредственно патоген). Если такого контроля не ведется, то эмбрионы, полученные от птиц, не могут быть использованы для последующей продукции вакциновых препаратов. В России в последние годы также вводятся методики контроля, в частности

разрабатываются методические рекомендации для мониторинга патогенов, которые необходимо контролировать при получении SPF эмбрионов для получения вакциновых препаратов.

Развитие методов молекулярной диагностики позволило внедрить сиквенс как в процесс создания лекарственных препаратов (изучение структур потенциальных мишени), так и в контроль их эффективности. Высокая скорость изменения поверхностных белков вируса, а вместе с этим и мишени основных противовирусных средств, привела к необходимости диагностике резистентности на молекулярном уровне — уровне идентификации маркерных мутаций резистентности.

Установление маркеров устойчивости к определенному препарату проводится при помощи вирусологических методов анализа: сначала определяется нуклеотидная последовательность гена, ответственного за синтез белка — мишени чувствительного штамма. Затем путем многократных пассажей в культуре клеток (при присутствии препарата) получают резистентный штамм. Определение изменений в гене, произошедших в результате потери чувствительности к препарату, позволяет установить мутации, характерные для резистентных штаммов. После подтверждения данных результатов в ходе независимых исследований с различными группами штаммов молекулярный анализ может проводиться независимо и на сегодняшний день является основным методом контроля чувствительности к противовирусным препаратам.

Изучение молекулярных и генетических характеристик штаммов вирусов и бактерий, циркулирующих во всем мире, является основным звеном системы мониторинга как эволюционных изменений в геноме патогенов, так и чувствительности к разрабатываемым

лекарственным средствам. Мутации, являющиеся маркерами устойчивости к лекарственным средствам, представляют интерес с точки зрения генетического признака, позволяющего идентифицировать резистентный штамм. Кроме того, они дают информацию о новой генетической особенности штамма, способной влиять на вирулентные и репродуктивные свойства патогена. Между тем такая информация необходима для системного контроля биологической активности лекарственных средств и является важнейшим этапом разработки эффективной тактики борьбы как с известными, так и новыми штаммами. Молекулярные методы рекомендованы Всемирной организацией здравоохранения и Международным эпизоотическим бюро как лабораторные тесты для определения патогенов, а также для постановки диагноза. Развитие данных методов позволяет перевести диагностику и лечение инфекционных заболеваний на существенно новый уровень, разрабатывать лекарственные и профилактические средства направленного действия, проводить эпизоотологические исследования патогенов. Молекулярные методы — это методы настоящего и будущего.

## Литература

- Гребенникова Т.В., Киреев Д.Е., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Разработка средств молекулярной диагностики гриппа А. Ветеринария. 2006; 5: 30.
- Киреев Д.Е., Аканина Д.С., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. разработка тест-систем для выявления и типирования вируса гриппа А на основе полимеразной цепной реакции. Вопросы вирусологии. 2007; 52(4): 17–22.
- Ленева И.А., Глушков Р.Г., Гуськова Т.А. Лекарственные средства для химиотерапии и химиопрофилактики гриппа: особенности механизма действия, эффективность и безопасность (обзор). Хим-фарм журнал. 2004; 38(11): 8–14.
- Ленева И.А., Шустер А.М. Противовирусные этиотропные химиопрепараты: эффективность против вирусов гриппа А подтипа H5N1. Вопросы вирусологии. 2006; 51(5): 1–8.
- Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Краснова М.А., Скотникова О.И., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Вестник Российского университета дружбы народов. 2004; 4(28): 300.
- Ротанов М., Гребенникова Т.В., Бурцева Е.И., Шевченко Е.С. Молекулярно-генетический анализ эпидемических штаммов вируса гриппа А, характеризующихся различной чувствительностью к римантадину, на основе нуклеотидной последовательности M2 белка. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2007; 4: 369–374.
- Ротанов М., Гребенникова Т.В., Бурцева Е.И., Шевченко Е.С. Молекулярно-генетический анализ эпидемических штаммов вируса гриппа А на основе нуклеотидной последовательности генов M2 и нейраминидазы. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2008; 2: 27–32.
- Abramson R., Stoffer S., Gelfand D. // FASEB. 1990; J4: A2293.
- Glukhov A.I., Trofimova M.E., Gordeev S.A., Grebennikova T.V., Vinogradov S.V., Kiselev V.I., Kramarov V. Amplification of the phage lambda DNA sequence by polymerase chain reaction using thermostable DNA polymerase. Molecular Biology. 1991; 25: 1602.
- Glukhov A.I., Grebennikova T.V., Kiselev V.I., Severin E.S. Molecular Biology. 1995; 29(4): 942.

11. Gottlib M., Chavko M. Analit. Biochem. 1987; 165: 33.
12. Grebennikova T.V., Glukhov A.I., Chistyakova L.G., Kiselev V.I., Severin E.S. Molecular Biology. 1995; 29(4): 542.
13. Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Lapa S.A. et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Infect. 2005; 11: 531–539.
14. European Pharmacopoeia. 7.0. 2010; [www.uapf.com.ua](http://www.uapf.com.ua).
15. Edwards K., Logan J., Saunders N. Real-time PCR, an essential guide. Horizon Bioscience. Wymondham. 2004; 346.
16. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR: Realtime monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 1993; 11: 1026–1030.
17. Kaledin A.S., Slyusarenko A.G. and Gorodetskii S.I. Isolation and properties of DNA polymerase from the extremely thermophilic bacterium *Thermus ruber*. Biokhimiya. 1982; 47: 1785–1791.
18. Kemp D.J., Smith D.B., Foot S.J., Samaras N., and Peterson M.G. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86(7): 2423–2427.
19. Kolchinsky A.M., Gryadunov D.A., Lysov I.P. et al. Microchips based on three-dimensional gel cells: history and perspectives. Mol. Biol. (Mosk). 2004; 38(1): 5–16.
20. Lawyer F.C., Stoffer S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.M. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. J. Biol. Chem. 1989; 264(11): 6427–6437.
21. Maxam A.M., Gilbert W. A new method of sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74(2): 560–564.
22. Mullis K.B., Falloona F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* a polymerase-catalysed chain reaction. Method in Enzymol. 1987; 155: 335–349.
23. OIE Reference Laboratories May 2005. [http://www.oie.int/eng/OIE/organisation/en\\_LR.htm](http://www.oie.int/eng/OIE/organisation/en_LR.htm)
24. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. WHO. Geneva. 2005.
25. Saiki R.K., Gelfand D.N., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 293: 487–491.
26. Saunders N.A. Quantitative real-time PCR. In: Real-time PCR an essential guide. Edwards K., Logan J., Saunders N. (Eds.). Horizon Bioscience. Wymondham. 2004.
27. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74(12): 5463–5467.
28. Thiebant F., Tsurno T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84: 7735–7738.
29. Viljoen G.J., Nel L.H., Crowther J.R. Molecular diagnostic PCR. Handbook. IAEA. 2005.

# МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (СЕКВЕНИРОВАНИЯ) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Южаков А.Г.

Генетическая характеристика инфекционных агентов играет центральную роль в диагностике, мониторинге и контроле инфекционных болезней. Всемирная организация здравоохранения обязательно запрашивает информацию о геноме как о части характеристики патогена [27]. В настоящее время для обозначения различных методов определения последовательности нуклеотидов применяют термин «секвенирование».

В 1970-х годах были разработаны первые методы секвенирования. Метод Максама—Гилберта основан на химической деградации меченого фрагмента молекулы ДНК при помощи специфических реагентов.

*Метод Сэнгера, или метод терминальных дидезоксинуклеотидов.* Данний метод основан на использовании четырёх типов дидезоксинуклеотидов, останавливающих синтез новой цепи ДНК ферментом ДНК-полимеразой. В 1980 году Сэнгер и Гилберт получили Нобелевскую премию по химии за разработку методов секвенирования. После того как метод Сэнгера смогли автоматизировать, используя флуоресцентно-меченные дидезоксинуклеоти-

ды и мультикариллярный электрофорез, секвенирование стало рутинной лабораторной процедурой. За одну реакцию автоматический секвенатор может определить до 1000 нуклеотидов, благодаря этому и низкому проценту ошибок секвенирование по методу Сэнгера до сих пор остаётся «золотым стандартом» секвенирования. Именно с помощью автоматических секвенаторов в 2003 году секвенировали первый полный геном человека [4].

Секвенирование по Сэнгеру относят к первому поколению методов секвенирования, но в 2005 году появились первые коммерчески доступные секвенаторы, работающие на основе методов следующего поколения (next generation sequencing, NGS, также используется термин высокопроизводительное секвенирование). В настоящее время несколько компаний выпускают секвенаторы, основанные на разных методах NGS, но основные этапы работы у них схожи: исследуемую ДНК нарезают на фрагменты определенной длины; к фрагментам лигируют (присоединяют при помощи фермента лигазы) адаптеры; проводят амплификацию каждого

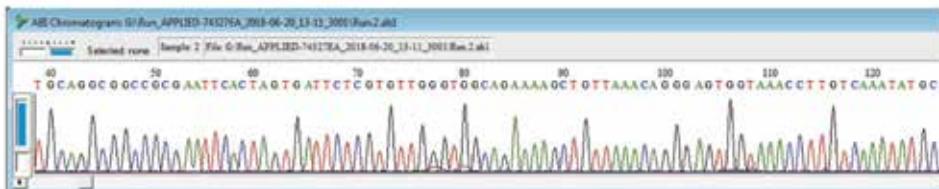


Рис. 1. Электрофорограмма последовательности нуклеотидов, полученная на автоматическом секвенаторе по методу Сэнгера (программа BioEdit)

отдельного фрагмента в изолированных от других фрагментов условиях; считывают нуклеотидную последовательность амплифицированных клонов ДНК; проводят анализ последовательности амплифицированных клонов ДНК (биоинформатика) [9, 12].

Основные преимущества NGS по сравнению с методом Сэнгера:

1. Низкая стоимость определения (за один нуклеотид).
2. Получение гигантских объёмов данных за один запуск (теперь геном человека можно секвенировать за один запуск прибора!).
3. Возможность секвенирования без знаний о первоначальной структуре последовательности.

Недостатки:

1. Высокая стоимость запуска.
2. Относительно короткая длина прочтения (от 50 до 500 нуклеотидов, в среднем около 200).
3. Требуется сложный компьютерный анализ огромного массива получаемых данных (биоинформатика).

В настоящее время разрабатываются методы «третьего поколения», или методы секвенирования одиночных молекул. Данные методы не используют амплификацию нуклеиновых кислот, что позволяет избежать появления ошибок, вносимых ДНК полимеразой, и позволяют получить очень длинные (до десятков тысяч нуклеотидов) прочтения, что существенно облегчает сборку геномов после секвенирования. Сейчас можно выделить две компании, уже выпускающие приборы на основе таких технологий: Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies, но число фирм-разработчиков много больше. Основной недостаток данных методов — высокий процент ошибок, даже по сравнению с технологиями «второго поколения» [14]. Отлично себя показывает объединение в одном экс-

перименте нескольких методов секвенирования: получение длинных, но не достаточно точных прочтений методом «второго поколения», получение нужного покрытия методами NGS и, если необходимо, уточнение сложных участков генома секвенированием по Сэнгеру [10].

## Использование секвенирования в ветеринарии

- При помощи NGS впервые были секвенированы полные геномы многих сельскохозяйственных животных: свиньи, коровы, овцы, лошади и др. Это важный источник знаний для понимания основ продуктивности, а также взаимоотношений в системе хозяин–патоген [8, 26].

- С появлением методов NGS селекционная работа проводится с «открытыми глазами», учёные видят не только изменения фенотипа, но и изменения генотипа, его вызвавшие [19, 28].

- Проводят секвенирование транскриптома (совокупности всех транскрибуемых РНК) для поиска новых генов, идентификации генов, задействованных в патологическом процессе [11, 18].

- Секвенированы полные геномы многих патогенных бактерий и вирусов, что позволяет работать над идентификацией маркеров патогенности, изучать эволюцию и филогенетические связи микроорганизмов, разрабатывать новые виды диагностики и лекарственные препараты [7, 13, 16].

- При помощи NGS проводят исследования микробиома (совокупности всех микроорганизмов), что особенно важно для жвачных, учитывая, какую роль играют микроорганизмы в их пищеварении. Например, в одном конкретном животном или среде обитания, в молоке, в почве, в воде, в воздухе [20, 22].

- Идентификация новых, неизвестных ранее патогенов [17, 24]. Например, открытие в 2011 году нового ортобуньявируса, вируса болезни Шмалленберг в ходе метагеномного секвенирования образцов от животных во время вспышки заболевания на фермах Германии [15].
- Подтверждение или открытие связи между патогеном и заболеванием при мультифакторной этиологии заболевания, например при респираторной патологии у КРС [21, 23].

## **Примеры использования секвенирования в животноводстве**

Рассмотрим подробнее несколько примеров использования секвенирования, в том числе высокопроизводительного, в животноводстве.

Наиболее яркий случай, открывший для многих ветеринаров новые методы секвенирования, произошёл в Германии. Летом и осенью 2011 года фермеры сообщили о заболевании молочного скота с коротким периодом явных клинических признаков (лихорадка, уменьшение удоев и диарея). Все известные возбудители заболеваний крупного рогатого скота были исключены диагностическими методами. Чтобы выявить причину заболевания, образцы крови пораженных животных были переданы на метагеномное секвенирование. В исследованных образцах был обнаружен геном нового вируса — ортобуньявируса, названного вирус болезни Шмалленберг. В дальнейшем в опытах на восприимчивых животных было доказано, что именно он вызвал заболевание [15]. При помощи полученных данных были быстро разработаны как диагностические наборы, так и средства специфической профилактики [5, 6].

Также в Германии был выявлен новый вирус, вызывающий энцефалит у КРС. У 15-месячной коровы развились нарушения центральной нервной системы, и она умерла в течение 6 дней после появления клинических признаков. Гистопатология выявила острый энцефалит, преимущественно в стволе головного мозга, и воспаление ганглия тройничного нерва с массивными некрозами нейронов. В диагностической лаборатории методами ПЦР и ИФА исключили панель основных бактериальных и вирусных инфекций крупного рогатого скота. Было принято решение проанализировать образец мозга коровы с использованием метагеномного подхода с секвенированием следующего поколения. Был обнаружен новый астровирус крупного рогатого скота (BoAstV-BH89/14). Последовательность нового вируса была на 71% идентична последовательностям астровируса овец и на 69% — двум недавно описанным астровирусам крупного рогатого скота из США и Швейцарии. Последние также были связаны со случаями энцефалита крупного рогатого скота. Хотя ранее астровирусы в основном обнаруживались при гастроэнтите у животных и людей, недавно обнаруженные астровирусные инфекции были связаны с энцефалитом [25].

Также в ходе метагеномных исследований у КРС были обнаружены ранее не встречающиеся у них вирусы, такие как гепацивирусы, нидовирусы, папилломавирусы, пикорнавирусы и ротавирусы [17].

Но не только высокопроизводительное секвенирование используется в ветеринарии. Так, для типирования одного из важнейших возбудителей болезни КРС — вирусов диареи КРС можно использовать «классическое» секвенирование по Сэнгеру. Для чего же нужно типировать вирусы диареи

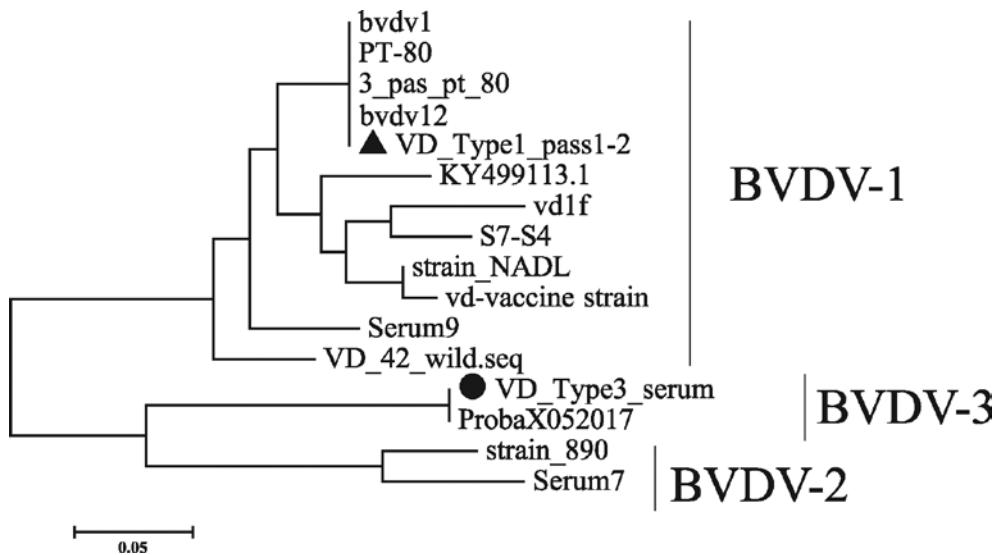


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена N про вируса диареи КРС (программа Mega)

КРС? В настоящее время выделяют три вида вирусов диареи КРС: ВД КРС-1, -2 и -3. На сегодняшний день показано, что все они могут вызывать патологию у восприимчивых животных. В России обнаружаются все эти виды вирусов. Вакцины же делаются в основном на основе первого вида вируса, при этом первый и третий виды вируса являются частыми контаминантами сывороток, использующихся при изготовлении вакцинных препаратов и, соответственно, могут попасть в готовый аттенуированный препарат и вызвать забо-

левание. Таким образом, необходимо типировать не только вирусы, вызвавшие заболевание у скота, но и проверять «живые» вакцины на наличие посторонних вирусов [1, 2].

Также при помощи секвенирования по Сэнгеру была показана коциркуляция двух ветвей (американской и европейской) герпесвируса четвёртого типа у КРС в Сибири. Остаётся открытым вопрос происхождения этих вирусов: являются ли они вновь завезёнными с импортируемым скотом или циркулировали в Сибири с давних пор [3].

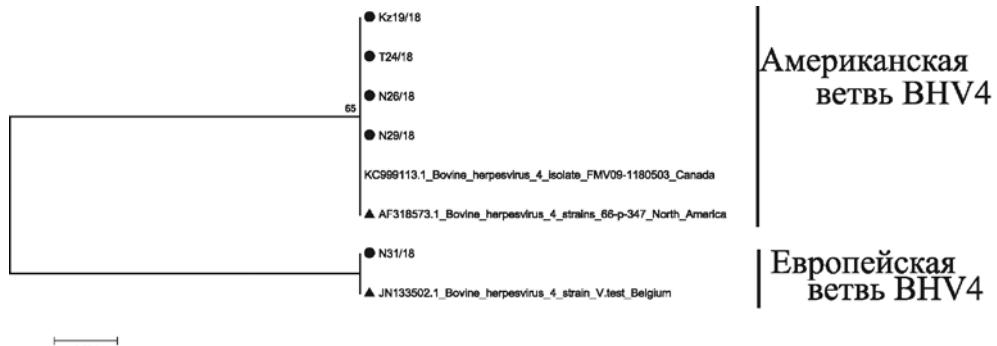


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена L герпесвируса четвёртого типа КРС (программа Mega)

Не будет преувеличением сказать, что появление методов секвенирования совершило революцию во всех биологических науках. Применение современных технологий позволяет ветеринарным лабораториям выйти на новый уровень в изучении жизнедеятельности животных, патогенезе заболеваний, изучении возбудителей болезней животных.

## Литература

1. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение нецитопатогенного изолята вируса диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота 2 генотипа на территории Российской Федерации. Вопросы вирусологии. 2009; 5: 43–47.
2. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максютов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. Вопросы вирусологии. 2018; 63(4).
3. Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Забережный А.Д. Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени. Вопросы вирусологии. 2019; 64(4).
4. Ребриков Д.В. и др. NGS: высокопроизводительное секвенирование. Под общей ред. Д.В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2014; 232.
5. Южаков А.Г., Гребенникова Т.В., Хаметова К.М., Мусиенко М.И., Верховский О.А., Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гулюкин М.И. Оценка протективных свойств экспериментальной инактивированной вакцины против болезни Шмалленберг. Ветеринария. 2016; 12: 11–16.
6. Южаков А.Г., Богданова О.Ю., Гребенникова Т.В., Хаметова К.М., Мусиенко М.И., Верховский О.А., Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гулюкин М.И. Результаты экспериментального заражения ягнят вирусом болезни Шмалленберг и разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления вирусной РНК. Ветеринария. 2015; 10: 21–25.
7. Anis E., Hawkins I.K., Ilha M.R.S., Woldemeskel M.W., Saliki J.T., Wilkes R.P. Evaluation of targeted next-generation sequencing for detection of bovine pathogens in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 2018; 56(7): e00399-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00399-18>.
8. Bai Y., Sartor M., Cavalcoli J. Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes. J. Anim. Sci. Biotechnol. 2012; 3: 8.
9. Barzon L. et al. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. J. Clin. Virol. 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.03.003>.
10. Beato M.S., Marcacci M., Schiavon E., Bertocchi L., Di Domenico M., Perserico A., Mion M., Zaccaria G., Cavichio L., Mangone I., Soranzo E., Patavino C., Cammà C., Lorusso A. Identification and genetic characterization of bovine enterovirus by combination of two next generation sequencing platforms. J. Virol. Methods. 2018; 260: 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.07.002>.
11. Bokma J., Vereecke N., De Bleecker K. et al. Phylogenomic analysis of *Mycoplasma bovis* from Belgian veal, dairy and beef herds. Vet. Res. 2020; 51(121). <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00848-z>.
12. Ejigu G.F., Jung J. Review on the Computational Genome Annotation of Sequences Obtained by Next-Generation Sequencing. Biology. 2020; 9: 295.
13. Feehan B.J., Penin A.A., Mukhin A.N., Kumar D., Moskvina A.S., Khametova K.M., Yuzhakov A.G., Musienko

- M.I., Zaberezhny A.D., Aliper T.I., Marthaler D., Alekseev K.P. Novel Mammalian orthorubulavirus 5 Discovered as Accidental Cell Culture Contaminant. *Viruses*. 2019; 11: 777.
14. Granberg F., Balint A. & Belak S. Novel technologies applied to the nucleotide sequencing and comparative sequence analysis of the genomes of infectious agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2016; 35(1): 25–42.
  15. Hoffmann B., Scheuch M., Höper D. et al. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 469–472.
  16. Hornyk A., Malik P., Marton S., Doro R., Cadar D. & Bőnyai K. Emergence of multireassortant bluetongue virus serotype 4 in Hungary. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 33: 6–10. doi:10.1016/j.meegid.2015.03.036.
  17. Kwok K.T.T., Nieuwenhuijse D.F., Phan M.V.T., Koopmans M.P.G. Virus metagenomics in farm animals: a systematic review. *Viruses*. 2020; 12: 107.
  18. Liu C., Liu Y., Liang L. et al. RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. *BMC Genomics*. 2019; 20: 774. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6120-4>.
  19. Mrude R., Ojango J.M.K., Okeyo A.M. and Mwacharo J.M. Genomic selection and use of molecular tools in breeding programs for indigenous and crossbred cattle in developing countries: current status and future prospects. *Front. Genet.* 2019; 9: 694. doi: 10.3389/fgene.2018.00694.
  20. Myer P. Bovine genome-microbiome interactions: metagenomic frontier for the selection of efficient productivity in cattle systems. *mSystems*. 2019; 4(3): e00103-19. DOI: 10.1128/mSystems.00103-19.
  21. Ng T.F., Kondov N.O., Deng X., van Eenennaam A., Neibergs H.L. & Delwart E. A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5340–5349. doi:10.1128/JVI.00064-15.
  22. O'Hara E., Neves A., Song Y., and Guan L. The role of the gut microbiome in cattle production and health: driver or passenger? *Annual Review of Animal Biosciences*. 2020; 8: 199–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083952>.
  23. Pardon B., Buczinski S. Bovine respiratory disease diagnosis what progress has been made in infectious diagnosis? *Vet. Clin. Food. Anim.* 2020; 36: 425–444.
  24. Polat M., Takeshima S., Hosomichi K. et al. A new genotype of bovine leukaemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*. 2016; 13: 4. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0239-z>.
  25. Schlottau K., Schulze C., Bilk S., Hanke D., Höper D., Beer M., Homann B. Detection of a novel bovine astrovirus in a cow with encephalitis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63: 253–259.
  26. Van Borm S., Belák S., Freimanis G. et al. Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? Article in *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). January. 2015.
  27. Van Borm S., Wang J., Granberg F. & A. Colling. Next-generation sequencing workflows in veterinary infection biology: towards validation and quality assurance. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2016; 35(1): 67–81.
  28. Vasoya D., La, A., Motta P. et al. Rapid identification of bovine MHC I haplotypes in genetically divergent cattle populations using next-generation sequencing. *Immunogenetics*. 2016; 68: 765–781. <https://doi.org/10.1007/s00251-016-0945-7>.

## VII. ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

### ЧУМА КРУПНОГО РОГАТО СКОТА

Орлянкин Б.Г., Верховский О.А., Мищенко В.А.

Чума крупного рогатого скота (КРС) — остропротекающее вирусное заболевание КРС, яков, диких африканских буйволов (*Syncerus caffer*) и азиатских буйволов (*Bubalus bubalis*), характеризующееся высокой заболеваемостью и смертностью.

Чума КРС была широко распространена в странах Европы и Азии в XVIII–XIX веках, и гибель от нее составляла сотни миллионов животных. В России в этот период также наблюдались крупные вспышки болезни. В ряде губерний ежегодная смертность составляла 150–300 тысяч животных. Путем убоя всех больных и подозреваемых в заражении животных (метод стемпинг-аут) и карантинных мероприятий чума КРС была ликвидирована в СССР в 1928 г. Однако в Читинской области и Республике Тыва в 1991–1993 гг. отмечали вспышки чумы у КРС и яков в результате ее заноса из Монголии. Благодаря применению культуральных вакцин из штаммов ЛТ и К30/70 и карантинным мероприятиям, чума была ликвидирована [4, 5, 8, 13, 14].

С 1994 г. Всемирная продовольственная организация ООН и Всемирная организация здравоохранения животных начали кампанию по искоренению вируса чумы КРС. В основе противоэпизоотических мероприятий лежала тотальная систематическая вакцинация КРС на неблагополучных территориях начиная с 1998 г. Последний случай заболевания зарегистрирован среди диких буйволов в Кении в 2001 г. (WAHIS). В период с 2002 по 2010 годы

полевых случаев чумы КРС зарегистрировано не было (WAHIS), и были получены отрицательные результаты многолетних мониторинговых исследований, подтверждающих отсутствие циркуляции вируса в популяциях восприимчивых животных. 25 июня — 2 июля 2011 г. на конференции ФАО была принята декларация о глобальной свободе от чумы крупного рогатого скота [24].

По оценкам ФАО, годовая экономическая отдача от ликвидации чумы крупного рогатого скота только в Африке составила около 920 млн USD.

**Этиология.** Возбудителем болезни является вирус с отрицательной РНК-цепью, который относится к роду *Morbillivirus* семейства *Paramyxoviridae*, порядка *Mononegavirales*. Вирусная природа возбудителя болезни впервые была установлена французскими учеными Николем и Адиль-Беем в 1902 г. путем заражения экспериментальных животных фильтратом перitoneального экссудата [7, 12].

Вирионы вируса чумы КРС представляют собой плеоморфные (чаще округлые) частицы диаметром 120–300 нм. Они состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеиновой оболочки, на поверхности которой имеются выступы длиной 10–12 нм, образованные гликопротеинами Н и F. Гликопротеин Н отвечает за адсорбцию вирионов на клеточной поверхности, а гликопротеин F — за их проникновение внутрь клетки путем сплавления (слияния) вирусной оболочки и кле-

точной мембранны. Поверхностные гликопротеины являются иммуногенами и индуцируют протективный иммунитет. Матриксный белок M составляет внутренний слой вирусной оболочки. Нуклеокапсид состоит из РНК и трех белков: N (белок нуклеокапсида), P и L (компоненты вирусной РНК-полимеразы). Геном вируса представлен единой однонитевой линейной молекулой минус-РНК, состоящей из 15 882 нуклеотидов. РНК не обладает инфекционностью и составляет всего 0,5% массы вириона. В вирионах содержится 70% белка, 20% липидов и 6% углеводов. Углеводы и липиды имеют клеточное происхождение [12, 18].

Различают три генетических линии вируса, четко различающиеся по своему географическому распространению: африканских линии 1 и 2 и азиатской линии 3, при этом вакцинация против одной из ветвей обеспечивает полноценную защиту против двух других, а дифференциацию вирусов, принадлежащих к разным ветвям, осуществляют только молекулярными методами.

Вирус чумы КРС имеет антигенное и генетическое родство с вирусами чумы плотоядных, кори и чумы мелких жвачных. Он хорошо размножается в первичных культурах клеток почек телят, ягнят и плодов коров, а также в перевиваемых линиях клеток Vero и MDBK с развитием цитопатического эффекта. Различают два типа поражения клеток: окружление и образование звездчатых клеток с рефрактильными отростками и образование гигантских многоядерных клеток — симпластов. В пораженных клетках образуются цитоплазматические и внутриядерные включения. Вирулентные штаммы вируса накапливаются в титрах 6,5–7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а аттенуированные — в титрах 5–6 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл [7, 10, 14].

Вирус чумы КРС чувствителен к жирорастворителям и детергентам, теряет

инфекционность при 60°C в течение нескольких минут, при 55°C — 20 минут. В условиях комнатной температуры сохраняет инфекционную активность в течение 4–6 дней, при 5°C — одну неделю, при –20°C — 4–6 месяцев, в лиофилизированном состоянии — более 5 лет. Обычные дезинфицианты быстро инактивируют вирус [7, 8, 18].

**Эпизоотология.** В естественных условиях к вирусу высокочувствительны крупный рогатый скот, зебу и буйволы, менее чувствительны овцы и козы. Дикие жвачные — лани, антилопы, газели, жирафы — также чувствительны к этому вирусу. Вирус также поражает свиней и многие другие виды диких животных отряда *Artiodactyla*, хотя не всегда в клинически выраженной форме; последние исследования показали, что овцы и козы также являются восприимчивыми животными, однако их эпизоотологическая значимость как хозяев вируса невелика [25].

Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные. Они выделяют вирус во внешнюю среду со слюной, молоком, мочой, фекалиями, истечениями из носа и половых органов. Роль жалящих и кровососущих насекомых в распространении вируса незначительна. Животные заражаются аэрогенно и алиментарно при поедании инфицированного корма. Чума КРС часто протекает в виде эпизоотий с заболеванием 50–80% животных в течение 2–3 недель. Скорость распространения эпизоотий зависит от концентрации животных и условий их содержания. В зонах, стационарно неблагополучных по чуме, болеет в основном молодняк, который теряет колостральный иммунитет, полученный от матерей. В странах, благополучных по чуме, где вакцинация не проводится, болезнь протекает в виде эпизоотий с высоким процентом летальности (80–100%) [14, 18].

**Патогенез.** Передача вируса происходит главным образом ороназально, и первичная репликация его осуществляется в миндалинах и лимфатических узлах глотки. Затем он с помощью крови попадает в селезенку, висцеральные лимфоузлы и лимфоидные ткани, ассоциированные с кишечником. Вирус размножается в лимфоцитах, эпителиальных клетках слизистых оболочек и лимфоидных клетках селезенки и лимфатических узлов. Степень поражения лимфоидных и эпителиальных клеток коррелирует с накоплением в них вируса. Наиболее выраженные изменения наблюдаются при обнаружении вируса в высоких титрах ( $6,5-7 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{мл}$ ). Вследствие поражения эпителиальных клеток слизистых оболочек кишечника развивается диарея, приводящая к быстрому обезвоживанию организма. Размножаясь в клетках кровеносных сосудов, он обуславливает повышение их проницаемости и развитие массовых кровоизлияний и воспалительно-некротических процессов. Развитие крупозного и дифтеритического воспаления связано с секундарной микрофлорой и сопровождается образованием эрозий и язв [12, 18].

**Клинические признаки.** Инкубационный период у крупного рогатого скота при естественном заражении составляет 3–17 дней, при экспериментальном — 3–7 дней. Заболевание чаще протекает остро, но иногда сверхостро и подостро [8, 14].

При остром течении болезни отмечают повышение температуры тела до  $41-42^\circ\text{C}$ , угнетение, слабость, жажду, прекращение жвачки, снижение удоев у лактирующих коров. На слизистой оболочке ротовой полости обнаруживают серо-желтые узелки величиной с просяное или конопляное зерно. Покрывающий их эпителий некротизируется, и на его месте образуются эрозии

и язвы. Наблюдают обильное пенистое слюнотечение, серозно-гнойный конъюнктивит и вагинит [1, 12, 18].

Поражение кишечного тракта в первые дни проявляется запором, а потом профузным поносом с выделением темно-бурых или кровянистых отвратительно пахнущих фекалий. Акт дефекации болезненный, слизистая оболочка прямой кишки выпячивается и приобретает темно-красный цвет. Животные быстро худеют, температура падает ниже нормы, гибель наступает на 7–9-й день болезни [1]. В зоне первичного поражения летальность достигает 90–100% [14].

Сверхострое течение болезни характеризуется высокой лихорадкой и быстрой гибелью животных (через 3–4 дня). Подострое течение наблюдают в зонах стационарно неблагополучных по чуме. Болезнь протекает со слабо выраженным симптомами, обычно без развития язвенно-некротических поражений слизистых оболочек. Животные, как правило, выздоравливают через 2–3 недели, погибает обычно молодняк. Летальность не превышает 20–40% [8, 12, 18].

**Патологоанатомические изменения** представлены в основном явлениями общего резко выраженного геморрагического диатеза и воспалительно-некротическими поражениями слизистых оболочек и лимфоидной ткани. На слизистой оболочке ротовой полости, зева и гортани обнаруживают серо-желтые наложения, под которыми находятся эрозии и язвы с неровными краями и ярко-красным кровоточащим дном. Пищевод и преджелудки обычно не изменены. Книшка наполнена сухими, плотными кормовыми массами. В полости съчуга скопление зловонной кирличневой жидкости. Слизистая оболочка его набухшая, ярко-красного цвета и пронизана многочисленными кровоизлияниями. Солитарные фолликулы и

пейеровы бляшки сильно увеличены, гиперемированы и покрыты фиброзным налетом, при удалении которого образуются язвы. Изменения в толстом кишечнике те же, но менее выражены, за исключением прямой кишки, в которой отмечают поражения, сходные с таковыми в тонком кишечнике. Мезентериальные лимфоузлы набухшие, сочные, красного цвета с кровоизлияниями и очагами некроза [1, 2, 12].

Селезенка не изменена, иногда отмечают набухание пульпы и кровоизлияния под капсулой. Печень дряблая и глинистого цвета. Желчный пузырь переполнен густой темно-бурой с примесью крови желчью. Почки набухшие, серо-желтого цвета, границы слоев сглажены. В слизистой лоханки и мочевого пузыря кровоизлияния, моча кровянистая и мутная. Слизистая трахеи и бронхов набухшая, покрасневшая, с кровоизлияниями и покрыта фибринозным налетом. Легкие полнокровны, иногда с очагами лобулярной, катаральной или крупозной пневмонии. Сердце растянуто, бледного цвета, дряблое, под эндокардом и эпикардом кровоизлияния [2, 18].

**Диагностика.** Окончательный диагноз на чуму КРС ставят по результатам лабораторных исследований, основанных на выделении вируса, обнаружении специфических антител и вирусной РНК. Для исследования используют пробы крови, селезенки и лимфоузлов. «Золотым стандартом» является выделение вируса в первичной культуре клеток почек телят или линии клеток Vero. Вирус идентифицируют в реакции нейтрализации с использованием специфической антисыворотки. Обнаружение вирусной РНК проводят методами ПЦР и ПЦР в реальном времени. Последний обладает высокой чувствительностью и высокой специфичностью, и с его помощью вирус обнаруживают за 2–4 дня до

начала клинических признаков болезни. Для выявления вирусного антигена в замороженных срезах тканей используют иммунофлуоресцентное и иммунопероксидазное окрашивание [3, 11, 15, 16, 17, 20].

Специфические антитела в сыворотке крови КРС обнаруживают в реакции нейтрализации и конкурентным методом иммуноферментного анализа. Материнские антитела у телят могут сохраняться до 4–8-месячного возраста [18, 22].

При дифференциальной диагностике чумы КРС следует исключить ящур, злокачественную катаральную лихорадку, вирусную диарею, инфекционный ринотрахеит, пастереллез и кровопаразитарные болезни, для чего используют комплекс лабораторных методов [3, 22].

**Специфическая профилактика.** До начала XX века чуму КРС контролировали только путем проведения ветеринарно-санитарных мероприятий. Первая инактивированная тканевая вакцина была разработана в Японии в 1918 г. В качестве инактиванта использовали глицерин. Формалин-инактивированная вакцина создана в 1926 г. Первая живая вакцина приготовлена из вируса, прошедшего более 200 пассажей на козах (1927 г.). Она обладала высокой остаточной вирулентностью. Затем были изготовлены живые вакцины из различных штаммов вируса, аттенуированных на кроликах и куриных эмбрионах [14, 18].

Первая культуральная вакцина была разработана В. Плоурайтом и Р. Феррисом в 1962 г. Ее готовили из вируса, прошедшего более 90 пассажей в первичной культуре клеток почек телят. Вакцина обладала слабой реактогенностью и создавала иммунитет продолжительностью более 4 лет. В Индии с целью замены культуры клеток почки

тelenka при массовом производстве вакцины адтenuированый штамм вируса был адаптирован к культуре клеток почки ягненка [21, 18].

В СССР до 1967 г. применяли инактивированную тканевую гидроокисьалюминиевую вакцину, предложенную П.М. Базылевым в 1956 г. С 1967 г. использовали живую культуральную вакцину из штамма ЛТ, полученного в 1963 г. Н.И. Митиным, Ю.И. Петровым и В.Н. Сюриным путем дальнейшей адаптации японского лапинизированного штамма LIII в культуре клеток почек телят. Вирус прошел 1271 пассаж на кроликах и 60 пассажей в культуре клеток, в том числе 8 пассажей методом предельных разведений для выделения генетически однородной и стабильной популяции. Вакцина обладает слабой реактогенностью и создает у привитых животных напряженный иммунитет продолжительностью более 3 лет [8, 9, 14].

Разработаны также были генно-инженерные (векторные) вакцины, с помощью которых можно отличить инфицированных животных от вакцинированных по наличию антител к вирусным белкам, не входящим в состав вакцины. Для создания векторных вакцин против чумы КРС использовали вирус оспы, в геном которого были встроены гены протективных белков (H и F) вируса чумы. Векторные вакцины способны обеспечить полноценную защиту от вирулентного вируса чумы КРС [19, 20, 23].

## Литература

1. Алексин А.Ф., Мищенко В.А. Особенности течения чумы среди крупного рогатого скота, выпасавшегося на отгонном пастбище. Мат-лы научной конф. ВНИИВВиМ. Покров. 1992; 151–152.

2. Архипов Н.И. Чума. Патологоанатомическая диагностика болезней крупного рогатого скота / Под ред. В.П. Шишкова, А.В. Жарова, Н.А. Налетова. М.: Агропромиздат. 1987; 137–141.

3. Верховский О.А., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Чума крупного рогатого скота. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д.К. Львова. М.: Медицинское информационное агентство. 2013; 865–869.

4. Коломышев А.А., Закутский Н.И., Балышев В.М. и др. Чума среди яков в Республике Тыва. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2013; 75–78.

5. Курченко Ф.П. Профилактика и мероприятия по ликвидации чумы крупного рогатого скота. Ветеринария. 1995; 8: 27–31.

6. Макаров В.В., Сухарев О.И., Коломышев А.А., Литвинов О.Б. Глобальное искоренение чумы крупного рогатого скота — выдающаяся победа мировой ветеринарии. Ветеринария. 2011; 9: 9–13.

7. Митин Н.И. Вирус чумы крупного рогатого скота. Руководство по ветеринарной вирусологии. Под ред. В.Н. Сюрина. М.: Колос. 1966; 570–580.

8. Митин Н.И. Чума. Инфекционные болезни крупного рогатого скота. М.: Колос. 1974; 58–73.

9. Митин Н.И., Сюрин В.Н., Петров Ю.И. Вирус-вакцина из штамма ЛТ против чумы крупного рогатого скота. Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. М.: 1966; 2: 14–16.

10. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Чума крупного рогатого скота. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика. 2007; 392–394.

11. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Чума крупного рогатого скота. Диагностика вирусных болезней животных. М.: Агропромиздат. 1991; 209–220.

12. Сюрин В.Н., Самуиленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Чума крупного рогатого скота и мелких жвачных. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП. 1998; 254–268.
13. Сарыглар Л.К-О. Эпизоотологические особенности чумы крупного рогатого скота в Республике Тыва. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Покров, 2005.
14. Чума крупного рогатого скота и мелких жвачных. Инфекционная патология животных. Под ред. А.Я. Самуиленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. М.: Академкнига. 2006; 1: 251–263.
15. Barret T, Amorel-Doel C., Kitching R.P. et al. Use of the polymerase chain reaction in differentiating rinderpest field virus and vaccine virus in the same animals. Rev. Sci. Tech. 1993; 12: 865–872.
16. Diallo A., Libean G., Couacy-Huynh E et al. Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. Vet. Microbiol. 1995; 44: 307–317.
17. Forsyth M.A., Barret T. Evolution of polymerase chain reaction for detection and characterization of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. Virus Res. 1995; 39: 151–163.
18. Lefevre P.C., Rossiter P. Rinderpest. Infectious and Parasitic Diseases of Livestock. Eds. P.C. Lefevre, J. Blancou, R. Charmette, G. Uilenberg. Lavoisier, 2010; 1: 225–244.
19. Ngichabe C.K., Wamwayi H.M., Ndungu E.K. et al. Long-term immunity in african cattle vaccinated with a recombinant capripox-rinderpest vaccine. Epidemiol. Infect. 2002; 128: 343–349.
20. Ohishi K., Inui K., Barret T. et al. Long-term protective immunity to rinderpest in cattle following a single vaccination with a recombinant vaccinia virus expressing the virus haemagglutinin protein. J. Gen. Virol. 2000; 81: 1439–1446.
21. Plowright W., Ferris R.D. Studies with rinderpest virus in tissue culture: the use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. Res. Vet. Sci. 1962; 3: 172–182.
22. World Organization for Animal Health (OIE). Rinderpest. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, 7th ed. 2012; 294–304.
23. Yamanouchi K., Barret T. Progress in the development of a heat-stable recombinant rinderpest vaccine using an attenuated vaccinia virus vector. Rev. Sci. Tech. 1994; 13: 721–735.
24. Декларация о глобальной свободе от чумы крупного рогатого скота. Тридцать седьмая сессия Конференции ФАО. Рим. 25 июня — 2 июля 2011 г.
25. Taylor W.P & Barrett T. Peste des Petits Ruminants and Rinderpest in Diseases of Sheep. Fourth Edition, Aitken I.D., ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. UK. 2007.

# ЯЩУР

Мищенко А.В., Мищенко В.А., Орлянкин Б.Г., Шевкопляс В.Н.

Ящур — остропротекающая высококонтагиозная вирусная болезнь сельскохозяйственных и диких парнокопытных и мозоленогих животных, проявляющаяся лихорадкой, везикулярными поражениями слизистой оболочки ротовой полости и безшерстных участков кожи головы, вымени, венчика и межкопытной щели. Ящур относится к трансграничным заболеваниям животных, имеет значительную важность для экономики, торговли и безопасности пищевых продуктов для значительного числа стран, может легко распространяться между странами и достигнуть эпидемических масштабов; и для которых контроль и управление требуется сотрудничества между странами [31, 48].

Самое раннее описание вероятного ящура крупного рогатого скота было сделано итальянским монахом Иеронимом Фракасториусом в Венеции в 1514 году.

Ящур является эндемичным заболеванием более чем в 90 странах, большинство из которых являются развивающимися странами Азии и Африки [52]. Ежегодные потери от ящура в эндемичных странах оценивают в 10% годового дохода [46] и составляет от 6,5 до 21 млрд USD в год [47]. Занос вируса в свободные от ящура страны также приводит к значительным экономическим потерям, которые складываются из затрат на ликвидацию и ограничений на международную торговлю продукцией сельского хозяйства [31].

**Этиология.** Вирусная природа возбудителя болезни впервые была установлена немецкими учеными Ф. Леффлером и П. Фрошем в 1897 г. [41]. Это первый открытый вирус животных. Воз-

будителем болезни является вирус, относящийся к роду *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae* порядка *Picornavirales*. Он состоит из геномной РНК, окруженной белковой оболочкой, или капсидом.

Вирионы вируса ящура представляют собой безоболочечный вирус с псевдо-T-3 икосаэдрическим капсидом размером 25–30 нм. Капсид состоит из 60 копий капсомеров. Каждый капсомер состоит из четырех структурных полипептидов VP1, VP2, VP3 и VP4, которые самоорганизуются в икосаэдрическую структуру диаметром 30 нм [14]. VP1, VP2 и VP3 находятся на поверхности вируса, а VP4 — внутри. Белковая оболочка окружает одноцепочечный геном с положительной РНК длиной около 8400 нуклеотидов.

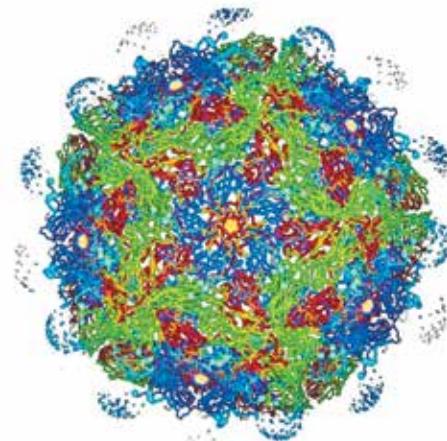


Рис. 1. Структура капсида вируса ящура

Геном вируса представляет собой положительную одноцепочечную РНК и кодирует одну длинную открытую рамку считывания (ORF), flankированную длинной структурированной

5'-нетранслируемой областью (5'-UTR) и короткой 3'-UTR. ORF транслируется в полипептидную цепь и процессируется в четыре структурных белка (VP1, VP2, VP3 и VP4), 10 NSP ( $L^{pro}$ , 2A, 2B, 2C, 3A,  $3B_{1-3}$ ,  $3C^{pro}$  и  $3D^{pol}$ ) и некоторые промежуточные продукты расщепления [33, 34, 35].

Вирус проникает в клетки посредством рецепторно-опосредованного эндоцитоза. В эндоцитических отсеках диссоциирует, высвобождая РНК в клетку для репликации [18, 34].

Размножение вируса ящура происходит в цитоплазме клеток. Вирионная РНК транслируется непрерывно с образованием полипротеина предшественника, который нарезается вирусными и клеточными протеазами на структурные и неструктурные белки. После трансляции вирионная РНК служит матрицей для образования минус-РНК. Последняя является матрицей для синтеза плюс-РНК. Сборка вирионов происходит в цитоплазме клеток в несколько этапов. В процессе морфогенеза образуются структуры с последовательно возрастающими коэффициентами седиментации. Зрелые вирионы освобождаются из клетки при ее разрушении путем лизиса [10, 12, 35].

В зависимости от генетических свойств циркулирующие штаммы вируса ящура разделены на 7 пулов. Каждый пул вируса циркулирует в определенном регионе: в Юго-Восточной Азии — пул № 1; Южной Азии — пул № 2; на Ближнем Востоке и Средней Азии — пул № 3; в Африке — пулы № 4–6; Южной Америке — пул № 7 [15, 40, 44].

В зависимости от антигенных свойств вирусов различают семь серотипов вируса ящура, а именно О, А, С, SAT 1, SAT 2, SAT 3 и Азия-1 с множеством их вариантов (топотипов, генетических линий).

В 1922 году Валле и Карре продемонстрировали, что существует два серотипа

ящура. Они назвали эти серотипы Vallée O и Vallée A в честь регионов, из которых они произошли [50]. Четыре года спустя Вальдманн и Траутвайн продемонстрировали существование трех серотипов, которые они назвали Waldmann A, B и C [51]. Waldmann A и Waldmann B оказались такими же, как Vallée O и Vallée A соответственно, в то время как Waldmann C оставался отдельным третьим серотипом. Имена Vallée O, Vallée A и Waldmann C были позже сокращены до О, А и С. В 1948 г. были идентифицированы в образцах из Бечуаналенда (Ботсвана) и Северной Родезии (Замбия) два новых серотипа [21]. Ретроспективное тестирование образцов из Южной Родезии (Зимбабве) 1930-х годов обнаружило оба этих новых серотипа, а также третий новый серотип. Эти новые серотипы были названы Южноафриканскими территориями (от англ. Southern African Territories) 1–3 (сокращенно SAT 1, SAT 2 и SAT 3). Серотип Asia 1 был идентифицирован в начале 1950-х годов у вирусов, выделенных из Индии и Пакистана [22, 28].

Глобальное распространение серотипов вируса ящура неравномерно:

- серотипы А и О циркулируют в большинстве эндемичных по ящуру регионах, за исключением южной части Африки;

- серотип Asia 1 циркулирует в эндемичных по ящуру регионах Азии;

- серотипы SAT 1 и SAT 2 вызывают заболевание по всей Африке, тогда как SAT 3 ограничен южной и небольшой областью в восточной Африке;

- серотип С вируса ящура не выявлялся с 2004 г., поэтому считается исчезнувшим [13].

Существует множество антигенных вариантов в пределах каждого серотипа. Во многих эндемичных странах Азии, Ближнего Востока и Африки одновременно циркулируют несколько серотипов и их антигенных вариантов.

Кроме того, антигенные различия внутри одного серотипа вируса могут быть значительными [15, 37, 52].

Иммунизация или переболевание одним из серотипов вируса ящура не защищает животное от заражения вирусом другого серотипа.

Вирус ящура высокочувствителен к изменениям концентрации водородных ионов. При pH 7,2–7,6 вирус длительно сохраняет свою активность, а при pH ниже 6 и выше 9 быстро инактивируется. Он относительно устойчив к влиянию температуры и выживает при 4°C в течение года, при 22°C — 8–10 недель, при 37°C — 10 дней, при 56°C — менее 30 минут. При низкой температуре (−40...−70°C) вирус сохраняет активность в течение нескольких лет [5, 6, 40].

Выдерживает сушку, может сохраняться в течение нескольких дней и недель в органическом веществе при влажных и прохладных температурах. Может сохраняться в загрязненном корме и окружающей среде более 1 месяца, в зависимости от температуры, влажности и значений pH. Вирус ящура сохраняет вирулентность до 14 суток в сухом навозе, 39 суток в моче, зимой — 6 месяцев в навозной жиже, 20 суток в сене/соломе, 3 дня в почве летом и до 28 суток в почве осенью [39]. В мясе убитых животных при температуре 10–12°C вирус погибает через 2 дня, а в замороженном до созревания мясе сохраняется несколько месяцев. Сохраняется в лимфатических узлах и костном мозге при нейтральном pH, но разрушается в мышцах при pH <6,0, т.е. после созревания [27]. В свежем охлажденном до 4°C молоке вирус сохраняет активность в течение 15 дней, при 18°C — 7 дней, при 37°C — 12 часов [6, 11].

Инактивируется гидроксидом натрия (2%), карбонатом натрия (4%), лимонной кислотой (0,2%), уксусной кислотой (2%), гипохлоритом натрия (3%),

пероксимоносульфатом калия/хлоридом натрия (1%) и диоксидом хлора. Устойчив к йодоформам, четвертичным соединениям аммония и фенолу, особенно в присутствии органических веществ [11].

**Эпизоотология.** К ящуру восприимчивы 105 видов дикой фауны, принадлежащих к 33 семействам и 14 отрядам. Все сельскохозяйственные и дикие парнокопытные и мозоленогие животные восприимчивы к вирусу ящура, включая оленей, антилоп, диких свиней, слона, жирафа [34]. Одногорбые верблюды из Евразии устойчивы к естественным инфекциям некоторыми штаммами, а южноамериканские верблюды, такие как альпаки и ламы, являются маловосприимчивыми и не имеют эпидемиологического значения [29, 30].

Африканский буйвол (*Syncerus caffer*) играет значительную роль в эпидемиологии ящура на территории Африки и является естественным хозяином для серотипов SAT [32, 34]. На территории Российской Федерации, Центральной и Средней Азии сайгаки и дзейрены могут участвовать в распространении ящура. Они поддерживают размножение вируса и распространение его путем прямого контакта или опосредованно через контаминацию пастбищ и водопоя [3].

Также ящуром болеет человек [6, 48].

Заболеваемость восприимчивых животных ящуром может достигать 100%. Смертность, как правило, низкая у взрослых животных (1–5%), у молодых телят, ягнят и поросят может быть до 100%. У некоторых видов животных инфекция может быть субклинической, например у африканских буйволов [5, 10, 11, 12].

Источником возбудителя инфекции являются животные с клиническими признаками и находящиеся в инкубационном периоде, выделяющие возбудитель с выдыхаемым воздухом, слю-

ной, фекалиями и мочой, переболевшие вакцинированные животные, у которых вирус ящура сохраняется в ротоглотке в течение более 28 дней [17, 32].

Вирус ящура у крупного рогатого скота обычно не сохраняется более 6 месяцев, хотя описаны случаи сохранения вируса в организме КРС до 3 лет. В редких случаях вирусоносители могут передавать инфекцию восприимчивым животным при тесном контакте. Вирусоносителями в популяции крупного рогатого скота могут быть 15–50% животных [27, 49]. Свиньи не являются вирусоносителями [49].

Основной путь проникновения вируса ящура в организм жвачных животных — через респираторную систему, чему способствуют низкие инфицирующие дозы [17]. При аэрогенном пути передачи вирус первичными и вторичными аэрозолями может распространяться на расстояние до 60 км над сушей и до 300 км над водной поверхностью [34]. Передача вируса аэрогенным путем сильно зависит от метеорологических условий, так как влажность является важным фактором сохранности возбудителя.

Несмотря на то, что ящур может распространяться на значительные расстояния аэрогенным путем, наиболее распространена передача возбудителя через прямой контакт между инфицированными и восприимчивыми животными и контакт восприимчивых животных с инфицированными вирусом фомитами (обувь, одежда, транспортные средства и т.д.) [49].

Для свиней наиболее характерен алиментарный путь передачи возбудителя через скармливание контаминированных вирусом кормов, мясных продуктов, выпойка молока, полученного от коров в инкубационном периоде и состояний вирусоносительства.

При эпизоотии ящура типа О в Великобритании в 2001 г. одним из путей по-

явления вторичных очагов ящура был ятrogenный путь передачи, который обусловлен тем, что люди могут сохранять вирус ящура в дыхательных путях в течение 24–48 часов. Поэтому для персонала, контактировавшего с инфицированными животными, необходим 7-дневный карантин [25].

Наиболее важные эпизоотологические особенности ящура следующие:

- разнообразные пути передачи возбудителя инфекции;
- короткий инкубационный период и значительное накопление вируса в тканях, секретах и экскретах и его выделение до появления клинических признаков болезни;
- длительное носительство вируса в организме животных (до 6–12 месяцев) и продолжительное сохранение его во внешней среде;
- широкий спектр восприимчивых домашних и диких животных;
- множественность серотипов и вариантов вируса и отсутствие перекрестной защиты [12].

**Патогенез.** Основной путь проникновения вируса ящура в организм жвачных животных — через респираторную систему, чему способствуют низкие инфицирующие дозы, в то время как для свиней основным путем передачи является алиментарный [12, 34, 49].

Первичная репликация вируса происходит в лимфоидной ткани верхних дыхательных путей и ротоглотки. Вирус в ротоглотке обнаруживали за 1–3 дня до появления первичной виремии и клинических признаков. После первичной репликации вирус попадает в региональные лимфоузлы и по лимфатическим путям — в кровь, где может циркулировать в течение 3–5 суток. Вторичная репликация происходит в эпителии ротовой полости, языка, на коже сосков вымени, венчика и межкопытцевой щели, что проявляется образова-

нием афт (везикул). У новорожденных животных, особенно свиней, вторичная репликация происходит в миокарде [17].

Выделение вируса ящура во внешнюю среду начинается за 2 дня до проявления клинических признаков. В молоке выделяли вирус ящура за 4 дня до появления первых клинических признаков. Выделение вируса во внешнюю среду обычно прекращается через 4–5 дней после появления везикул, за исключением рото-глоточной жидкости (пробанг) [17, 49].

Пораженные после ящура участки обычно заживают в течение 10 суток после появления, при условии отсутствия осложнений, вызванных бактериальной инфекцией.

**Клиническая картина.** Инкубационный период при ящуре варьирует от 1 до 14 суток, чаще всего составляет 2–6 дней [49]. Степень тяжести клинических признаков варьирует в зависимости от штамма вируса, инфицирующей дозы вируса, возраста и породы, вида животного-хозяина и уровня его иммунитета. Клинические признаки могут варьировать от слабых до сильно выраженных.

Первичная виремия вызывает повышение температуры тела животного, что является первым клиническим признаком ящура у всех видов восприимчивых животных.

У крупного рогатого скота за 2–3 дня до появления клинических признаков происходит снижение молочной продуктивности. В начале патологического процесса отмечается повышенная саливация, ухудшение аппетита, в дальнейшем повышается температура (до 40,5–41,5°C), животное отказывается от корма, прекращается жвачка, возникает болезненность при доении. В слизистой оболочке ротовой полости, эпителии языка происходит образование везикул (афт), заполненных вначале прозрачной опалесцирующей, а затем мутной жидкостью (лимфой). Через 12–24 часа стенки афт разрываются и на их месте образуются эрозии, которые заживают в течение 10 суток. В это время температура тела снижается до нормальных значений, наступает обильная саливация. В результате чмокающих движений в углах рта появляется пенистая масса.



Рис. 2. Обильная саливация у больного ящуром КРС

Через 2–3 дня после появления афт в слизистой языка у животных отмечают хромоту, вызванную образованием афт в области межкопытной щели и венчика, а также на сосках молочных железах (вымени) [7].

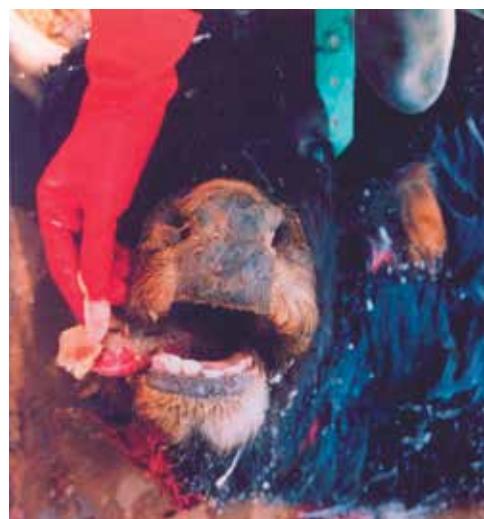


Рис. 3. Афтозные поражения слизистой оболочки языка



Рис. 4. Эрозии после вскрытия афт при ящуре у КРС



Рис. 5. Эрозии после вскрытия афт на сосках вымени при ящуре у КРС

При ящуре часто отмечаются осложнения: эрозия языка, суперинфекция, деформация копыт, мастит и постоянное снижение производства молока, миокардит, abortionы, потеря веса.

Выздоровление в неосложненных случаях обычно происходит в течение 8–15 дней.

При миотропной форме ящура наступает смерть животных от миокардита без образования афтозных поражений на слизистой и эпителии.

При ящуре у мелкого рогатого скота отмечают лихорадку, угнетение, отказ от корма, прекращение жвачки, сализация проявляется редко. Афтозные поражения слабо выражены и могут оставаться незамеченными. Поражения в основном регистрируются в области венчика и межкопытцевой щели,

что приводит к хромоте животных. Поражения слизистой ротовой полости и языка также слабо выражены, афты мелкие, рано вскрываются и при отсутствии осложнений быстро заживают [8]. У дойных овец и коз регистрируют агалактию.

Гибель новорожденных ягнят и козлят может происходить без клинических признаков от миокардиодистрофии.

У свиней первые признаки ящура — угнетение, снижение аппетита, затрудненное передвижение, повышение температуры тела выше 41°C. Больные животные малоподвижны, передвигаются на согнутых конечностях. Ящур у свиней проявляется в виде везикулярных поражений, которые в основном регистрируются на коже венчика, мякишем и межкопытцевой щели конечностей, часто отмечается спадение рогового башмака копытец. Иногда (у 10–20% свиней) везикулы (эррозии) обнаруживаются на коленях, пятаке и на коже перехода пятака в рыло. У 5–10% животных на слизистой языка выявляют быстро заживающие поверхностные везикулы (эррозии) размером не больше 3–5 мм. У содержащихся на твердом полу свиней ящурные поражения выражены сильнее, чем у животных, содержащихся на мягкой подстилке. У супоросных свиноматок регистрируют abortionы и мертворождения. Ящурные везикулярные поражения отмечают на коже и сосках вымени лактирующих свиноматок.

У поросят-сосунов ящур протекает в безафтозной миокардиопатической форме, с высокой смертностью (60–100%), без проявления клинических признаков [4, 12].

**Патологоанатомические изменения.** Частота и степень поражения тех или иных органов зависит от вирулентности вируса, вызвавшего инфекцию, ее формы, возраста и состояния животных, условий содержания. У заболевших жи-

вотных обнаруживают различной величины единичные или множественные афты, а также эрозии в ротовой полости, на языке, внутренней стороне губ и щек, зубной подушке, твердом нёбе, деснах, на конечностях, вымени, а также в рубце. При вскрытии животных обнаруживают кровоизлияния, афты и эрозии на слизистых оболочках глотки, носовой полости, гортани, трахеи и бронхов, брюшине, слизистой оболочке съчуга и тонкого кишечника, геморрагический гастроэнтерит и катаральный мастит.

При миотропной форме ящура на вскрытии павших или вынужденно убитых животных отмечаются поражения сердечной и скелетных мышц, миокардит и миозит, серые или желтые полосы в сердце от дегенерации до некроза миокарда у животных всех видов («тигровое сердце»). Микроскопически в пораженных участках миокарда отмечают дистрофически-некротические процессы в мышечных волокнах и явления расстройства кровообращения. Часто наблюдают отложение солей извести в пораженных мышечных волокнах [12, 34].

**Диагностика.** По клиническим проявлениям ящур невозможно отличить от других везикулярных заболеваний (везикулярный стоматит, везикулярная болезнь свиней, везикулярная экзантема свиней, сенекавирусная инфекция). Ящур необходимо дифференцировать от чумы крупного рогатого скота, вирусной диареи крупного рогатого скота, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, блутанга, контактизного пустулезного дерматита, эктимы, злокачественной катаральной горячки, чумы мелкого рогатого скота и псевдооспы коров [2, 48, 49].

Наиболее предпочтительным патологическим материалом для лабораторной диагностики является эпителий из неразорвавшихся или только что разорвавшихся афт или афтозная жидкость.

Если их получение невозможно, в качестве альтернативного источника вируса берутся пробы крови и/или образцы жидкости из глотки и пищевода, отбираемой с помощью пищеводно-глоточного зонда у жвачных животных или мазки из зева у свиней. При миотропной форме — ткань миокарда или гепаринизированная кровь [1, 12, 32, 38].

Диагностика ящура осуществляется посредством выделения вируса или демонстрации антигена или нуклеиновой кислоты вируса ящура в образцах тканей или жидкости. Обнаружение вирус-специфических антител также может быть использовано для диагностики, а наличие антител к неструктурным белкам может использоваться в качестве индикатора наличия инфекции, независимо от статуса по вакцинации [48].

Для постановки положительного диагноза достаточно обнаружения антигена или нуклеиновой кислоты вируса ящура [1].

Для обнаружения антигенов вируса ящура и серотипирования используется иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция связывания комплемента (РСК) [32]. РСК является менее специфичным и чувствительным методом, чем ИФА, а также подвержен влиянию про- и антикомплементарных факторов. Методы ИФА, РСК подходят для исследования эпителиальных супензий, везикулярной жидкости или супернатантов культуры клеток, но они недостаточно чувствительны для прямого исследования образцов пищеводно-глоточной жидкости [43].

Для выявления генома вируса ящура пробы исследуют с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [23, 45]. Для выделения вируса используют культуры клеток: щитовидной железы крупного рогатого скота (теленка), клетки почек свиней, ягнят и телят или клеточные ли-

нии с аналогичной чувствительностью. При полном проявлении цитопатогенного действия (ЦПД) в культурах собранные жидкости можно исследовать на наличие вируса ящура, используя ИФА, РСК или ОТ-ПЦР.

Для определения происхождения вирусов ящура проводится секвенирование и последующий филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена VP1 [19, 37, 43].

Серологические тесты на наличие антител к вирусу ящура проводят для подтверждения подозрительных случаев ящура, доказательства свободы от инфекции, мониторинга уровня иммунитета, индуцированного вакцинацией в полевых условиях, сертификации отдельных животных перед импортом и экспортом [32, 48].

Существует два вида серологических тестов на наличие антител к вирусу ящура: тесты для обнаружения антител к структурным белкам вируса (SP) и тесты для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса (NSPs) [32].

Антитела к структурным белкам вируса ящура являются серотип-специфическими, индуцируются вакцинацией или инфекцией. Антитела к структурным белкам выявляются: в реакции нейтрализации вируса [24, 26], твердофазным конкурентным ИФА [16, 20, 41] и жидкофазным блокирующими ИФА [36]. Эти тесты являются высокочувствительными при условии, что вирус или антиген, используемый в тесте, имеет высокую степень соответствия со штаммом, циркулирующим в полевых условиях [24, 42].

Неструктурные белки, в отличие от структурных белков, не являются серотип-специфическими. Для обнаружения антител к неструктурным белкам используют ИФА или иммуноферментный электроблот (EITB) [20, 32].

**Специфическая профилактика и меры борьбы.** Основными мероприятиями предупреждения заноса вируса ящура являются: сотрудничество с другими странами по координации, взаимодействию и обмену информацией по эпизоотической ситуации, контроль при импорте животноводческой продукции, контроль перемещения животных и продукции риска, зонирование, система биобезопасности [9].

К мерам специфической профилактики ящура относится вакцинация восприимчивой популяции животных, которая направлена на формирование популяционного иммунитета как основного фактора, препятствующего возникновению и распространению заболевания даже в случае заноса возбудителя.

Целевой популяцией, подлежащей вакцинации против ящура, на территории РФ является КРС и МРС; профилактическая вакцинация свиней не осуществляется, так как при выполнении всех требований биобезопасности для свиноводческих предприятий закрытого типа, риск заноса вируса ящура минимальный [9].

Для специфической профилактики ящура используются инактивированные вакцины. Вакцины против ящура содержат определенное количество различных серотипов вируса, полученных посредством клеточного культивирования. Большинство вакцин являются поливалентными для обеспечения соответствия антигенному разнообразию возбудителей, которые циркулируют в определенном регионе. В зависимости от используемого адьюванта вакцины разделяются на сорбированные и эмульсионные.

Для вакцинации животных с целью профилактики и контроля вспышек ящура необходимо использовать вакцины с протективной активностью не

менее 6 PD50 ввиду их более широкого спектра предоставляемого иммунитета, а также быстрого наступления защиты [31].

Для контроля эффективности профилактической вакцинации против ящура должны проводиться мониторинговые исследования по определению поствакцинального популяционного иммунитета [48].

Основой для борьбы с ящуром являются нормативные правовые акты в сфере ветеринарии, регламентирующие предоставление информации о мероприятиях по профилактике ящура, о возникновении ящура и перечень мероприятий по ликвидации вспышки ящура. В настоящее время таким нормативным правовым документом являются ветеринарные правила [1].

Основной стратегией ликвидации вспышки ящура является уничтожение больных и контактных животных [2]. В зависимости от условий и возможностей стран применяются разные стратегии ликвидации очага ящура:

а) «стемпинг-аут» — уничтожение всех животных в эпидемиологических единицах без проведения кольцевой вакцинации;

б) уничтожение животных в эпизоотических очагах с проведением вынужденной вакцинации в угрожаемой зоне с последующим убоем всех вакцинированных животных;

в) уничтожение всех животных в эпизоотических очагах с проведением вынужденной вакцинации в угрожаемой зоне без последующего убоя вакцинированных животных.

К сожалению, многие эндемичные по ящуру страны используют только вынужденную вакцинацию в ответ на вспышку, без уничтожения больных и переболевших животных, что приводит к формированию стационарного неблагополучия по ящуру.

## Литература

1. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов ящура. Утверждены приказом Минсельхоза России № 564 от 6 декабря 2018 г.; 19.
2. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Дудников С.А и др. Опыт ликвидации ящура в первичных очагах. Ветеринария. 2011; 11: 7–12.
3. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Захаров В.М. и др. Роль диких жвачных животных в распространении ящура. Ветеринария. 2012; 11: 3–5.
4. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Карапулов А.К. Патологический процесс при экспериментальном и спонтанном ящуре у свиней. Ветеринария. 2015; 4: 19–23.
5. Онуфриев В.П. Ящур. Инфекционные болезни крупного рогатого скота. М.: Колос. 1974; 3–19.
6. Орлянкин Б.Г., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Ящур. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д.К. Львова. М.: Медицинское информационное агентство, 2013; 878–881.
7. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Джалиди Г.А., Кривонос Р.А., Черных О.Ю. Ошибки при клинической диагностике ящура у крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани. 2014; 1: 22–23.
8. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Шевкопляс В.Н., Кривонос Р.А., Черных О.Ю. Проблема клинической диагностики ящура у овец и коз. Ветеринария Кубани. 2016; 6: 8–10.
9. Рахманин П.П., Соболев В.В., Соловьев Б.В. и др. Проблема профилак-

- тики и ликвидации ящура сельскохозяйственных животных. Ветеринария. 2012; 1: 9–11.
10. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Ящур. Вирусы и вирусные болезни животных. М.: Библионика, 2007; 452–457.
  11. Сюрин В.Н., Самуilenko А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Ящур. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 1998; 532–548.
  12. Ящур. Под ред. Бурдова А.Н. М.: Агропромиздат. 1990; 320.
  13. 85th General Session of the OIE (Resolution 30) Resolution No. 30 (Foot-and-Mouth Disease Serotype C) Adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE on 23 May 2017 in view of an entry into force on 26 May 2017).
  14. Acharya R., Fry E., Stuart D., Fox G., Rowlands D., Brown F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*. 1989; 337: 709–716.
  15. Hammond J. et al. Analysis of the Worldwide FMD Situation. Trend and Regional Differences. FAO/OIE Global Conference on FMD Control. Bangkok. Thailand. 27–29 June 2012.
  16. Brocchi E., De Simone F., Bugnetti M. et al. Application of a monoclonal antibody based competition ELISA to the measurement of anti-FMDV antibodies in animal sera. Rep. Europ. Commiss. Control FMD (Sess. Res. Group Stand. Tech. Comm.). Lindholm. Denmark. App. 14. Rome. Italy. 1990.
  17. Arzt J., Branan M.A., Delgado A.H., Yadav Sh., Moreno-Torres K.I., Tildesley M.J. and Stenfeldt C. Quantitative impacts of incubation phase transmission of foot-and-mouth disease virus. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 2707.
  18. Baxt B., Bachrach H.L. Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. *Virology*. 1980; 104: 42–55.
  19. Beck E., Strohmaier K. Subtyping of European Foot-and-Mouth Disease Virus Strains by Nucleotide Sequence Determination. *Journal of virology*. 1987; 5: 1621–1629.
  20. Brocchi E., Bergmann I.E., Dekker A. et al. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*. 2006; 24: 6966–6979.
  21. Brooksby J.B. The virus of foot-and-mouth disease. *Virus Research*. 1958; 5: 1–37.
  22. Brooksby J.B., Rogers J. Methods used in typing the virus of foot-and-mouth disease at Pirbright, 1950–55. Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease virus: Project No. 208 (31–34). Paris. France. 1957.
  23. Callahan J.D., Brown F., Csorio F.A. et al. Use of portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002; 220: 1636–1642.
  24. Robiolo B., La Torre Maradei J.E., Perez Beascochea C. et al. Confidence in indirect assessment of foot-and-moot disease vaccine potency and vaccine matching carried out liquid phase ELISE and virus neutralization test. *Vaccine*. 2010; 28(38): 6235–6241.
  25. Cottam E.M., Wadsworth J., Shaw A.E., Rowlands R.J., Goatley L., Maan S., Maan N.S., Mertens P.P., Ebert K., Li Y., Ryan E.D., Juleff N., Ferris N.P., Wilesmith J.W., Haydon D.T., King D.P., Paton D.J., Knowles N.J. Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog*. 2008; 44.
  26. Cottral G.E. Foot-and-mouth disease virus neutralization test cross reactions. *Bull. Off. Intern. Epiz.* 1972; 77: 7–8.
  27. Cottral G.E. Persistence of foot-and-mouth disease virus in animal, their

- products and the environment. Bull. Off. Intern. Epiz. 1969; 71 (3–4): 549–568.
28. Dhanda M.R., Gopalakrishnan V.R., Dhillon H.S. Note on the occurrence of atypical strains of foot-and-mouth diseases virus in India. Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry. 1957; 27: 79–84.
  29. Alexandersen S., Wernery U., Nagy P. et al. Dromedaries (*Camelus dromedaries*) are of very low susceptibility to experimental, high-dose inoculation with FMDV Serotype O and do not transmit the infection to direct contact camels or sheep. Europ. Commiss. Control Foot-and-Mouth Disease (EUFMD). Paphos. Cyprus. 17 – 20 Oct. 2006; Rome. 2006; 158–164.
  30. Alexandersen O.S., Wernery U., Nagy P. Dromedaries (*Camelus dromedarius*) are of low susceptibility to inoculation with foot-and-mouth disease virus serotype. J. Comp. Pathol. 2008; 139(4): 187–193.
  31. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The progressive control pathway for FMD control. Principles, stage descriptions and standards. 2012.
  32. Foot and mouth disease. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 6th ed. Paris. 2012; 2 (Ch. 2.1.5): 145–173.
  33. Fry E.E., Newman J.W., Curry S., Naijam S., Jackson T., Blakemore W., Lea S.M., Miller L., Burman A., King A.M., Stuart D.I. Structure of Foot-and-mouth disease virus serotype A10 61 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. J. Gen. Virol. 2005; 86: 1909–1920.
  34. Grubman M.J., Baxt B. Foot-and-Mouth Disease. Clinical Microbiology Reviews. 2004; 17: 465–493.
  35. Grubman M.J. The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. Arch Virol. 1980; 63: 311–315.
  36. Hamblin C., Barnett I.T.R., Hedger R.S. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against FMD virus. I. Development and method of ELISA. J. Immunol. Methods. 1986; 93(1): 115–121.
  37. Jamal S.M., Ferrari G., Ahmed S., Normann P., Curry S., Belsham G.J. Evolutionary analysis of serotype A foot-and-mouth disease viruses circulating in Pakistan and Afghanistan during 2002–2009. J. Gen. Virol. 2011; 44: 2849–2864.
  38. Jamal S.M., Ferrari G., Hussain M., Nawroz A.H., Aslami A.A., Khan E., Murvatulloev S., Ahmed S., Belsham G.J. Detection and genetic characterization of foot-and-mouth disease viruses in samples from clinically healthy animals in endemic settings. Transbound Emerg Dis. 2012; 44: 429–440.
  39. Bartley L.M., Donnelly C.A., Anderson R.M. Review of foot-and-mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites. Veterinary Record. 2002; 151: 667–669.
  40. Leforban Y., Sumption K. Foot and mouth disease. Infectious and Parasitic Diseases of Livestock. Eds. P.C. Lefevre, J. Blancou, R. Charmette, G. Uilemberg. Lavoisier. 2010; 1: 299–324.
  41. Loeffler F., Frosh P. Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen zur Erforschung der Maul-und-Klau enzephalitis. Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. 1. 1897; 22: 257–259.
  42. Paiba G.A., Anderson J., Paton D.J. et al. Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). J. Virol. Methods. 2004; 115: 145–158.
  43. Reid D.M., Ferris N.P., Hutchings G.H. et al. Diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. Vet. Rec. 2001; 149: 621–623.
  44. Samuel A.R., Knowles N.J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct

- evolutionary lineages (topotypes). *J. Gen. Virol.* 2001; 44: 609–621.
45. Shaw A.E., Reid S.M., Ebert K. et al. Protocol: Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods*. 2007; 143: 81–85.
46. Knight-Jones T.J.D., McLaws M., Rushton J. Foot-and-Mouth Disease Impact on Smallholders — What Do We Know, What Don't We Know and How Can We Find Out More? *Transbound Emerg Dis.* 2017; 64(4): 1079–1094.
47. Knight-Jones T.J.D., Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease — what are they, how big are they and where do they occur? *Preventive Veterinary Medicine*. 2013; 112: 161–173.
48. Terrestrial Animal Health Code. Vol. 2. Chapter 8.8. Infection with foot and mouth disease virus. OIE. Paris. France. 2018.
49. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. et al. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003; 129: 1–36.
50. Vallée H., Carré H. Sur la pluralité du virus aphéteux. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Paris*. 1922; 174: 1498–1500.
51. Waldmann O., Trautwein K. Experimentelle Untersuchungen über die Pluralität des Maul-und Klauenseucheviruss. *Berl. Tierärztl. Wochenschrift.* 1926; 42: 569–571.
52. World Animal Health Information Database (OIE. Disease Information) Interface. OIE. Paris. France. 2020.

# ЭНЗООТИЧЕСКИЙ ЛЕЙКОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Гулюкин М.И., Степанова Т.В.

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота представляет собой злокачественное лимфопролиферативное заболевание, этиологическим агентом которого является вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС, BLV). У естественного хозяина — крупного рогатого скота — вирус поражает преимущественно В-лимфоциты, у 30% инфицированных животных вызывает персистентный лимфоцитоз, а у 0,1–10% — тяжелую патологию, в основном лимфоидный лейкоз или лимфосаркомы [Kabeya et al., 2001].

**Краткая историческая справка.** Название болезни «лейкоз» происходит от греческого слова λευκός, что означает ‘белый’. Начало учения о лейкозе связано с именем известного немецкого морфолога Рудольфа Вирхова, который в 1845–1853 годах впервые описал болезнь у человека и выделил ее в самостоятельную нозологическую единицу под названием «лейкемия», или белокровие, поскольку белые элементы крови придают ей более или менее белую окраску. При этом автор выделил две ее формы: селезеночную, проявляющуюся увеличением селезенки и появлением в крови больных лейкоцитарных форм, и лимфатическую, сопровождающуюся увеличением лимфоузлов и появлением малых клеток — лимфоцитов.

Несколько позднее появились сообщения о лейкозе животных. Первый случай лейкемии у лошади описал патологоанатом Дрезденского ветеринарного института Лейзеринг в 1858 году. О. Зидамградский в 1871 году сделал сообщение о лейкемии у собак и кошек, а в 1878-м он же описал эту болезнь у крупного рогатого скота. В обзоре литературы по лейкозам животных

Н. Добберштейн отметил, что лейкозом болеют 29 видов животных и 15 видов домашних и диких птиц. По мнению Визнера, есть все основания считать, что лейкоз диагностируют у всех видов млекопитающих.

В процессе изучения эту болезнь называли по-разному: лейкемия, белокровие, рак крови, гемобластоз, энзоотический лейкоз. В. Эллерман предложил заменить название болезни «лейкемия» термином «лейкоз», который более полно характеризовал патологический процесс, развивающийся в кроветворной ткани независимо от изменений, наблюдаемых в периферической крови. Несколько позднее Х.Х. Владос, Н.А. Краевский и другие исследователи предложили новое название болезни — «гемобластозы», то есть опухолевые заболевания крови, так как при лейкозе наблюдали гиперплазию клеток кроветворной и лимфоидных тканей с развитием злокачественных опухолей. Несмотря на обоснованность термина «гемобластозы», в нашей стране принято употреблять термин «лейкоз».

Опухолевая природа лейкозов была подтверждена многими исследователями более столетия тому назад, в том числе нашими соотечественниками К. Славянским и А. Щастным, и в настоящее время является общепризнанной. По характеру и месту локализации опухолевых клеток к определенным росткам гемопоэза гемобластозы разделены на две группы:

— лейкозы — системные поражения органов кроветворения, включающие лимфоидную, миелоидную, моноцитарную и недифференцированную формы;

— гематосаркомы — сопровождающиеся опухолевым ростом. К ним отно-

сятся лимфосаркома, ретикулосаркома, лимфогранулематоз и миелолейкоз.

В то же время следует отметить, что лейкозу присущи свои патогенетические особенности, обусловленные вовлечением в патологический процесс кроветворной ткани. Лейкоз характеризуется системным поражением органов кроветворения, отсутствием избирательной, ограниченной локализации, особенностями метастазирования. Лейкозные клетки, в отличие от раковых, разрастаясь, не прорастают в ткани, а раздвигают их.

Важнейшим путем познания сути болезни являются экспериментальные исследования. Первым шагом на пути эксперимента в онкологии явилась трансплантация опухолей, впервые осуществленная нашим соотечественником, магистром ветеринарных наук М.А. Новинским в 1876 году на собаках.

Выдающуюся роль в развитии учения об экспериментальном лейкозе сыграла работа Эллермана и Банга (1908). Им удалось воспроизвести заболевание у подопытных кур не только трансплантацией лейкозной ткани и крови, но и использовать их фильтрат, впервые доказав инфекционную природу болезни.

До середины прошлого столетия в нашей стране не имели представления о существовании лейкоза у животных как нозологического заболевания. Единичные случаи падежа и вынужденного убоя животных с опухолевыми поражениями относили к спорадическому лимфоденозу, что не вызывало особого беспокойства. Однако после Великой Отечественной войны вследствие завоза поголовья из неблагополучных по лейкозу стран Западной Европы болезнь получила повсеместное стационарное распространение.

Изучением лейкоза крупного рогатого скота в СССР стали заниматься в 1959 году, после создания группы

ученых под руководством профессора Н.В. Румянцева.

Противолейкозные мероприятия в нашей стране стали проводить в законодательном порядке с 1965 года согласно инструкциям по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. В первых опытах борьбы с заболеванием использовалась выбраковка животных, у которых выявляли клинические признаки, увеличение в крови лимфоцитов. Проведение оздоровительных мероприятий путем выбраковки и сдачи на убой больных животных позволяло несколько улучшить эпизоотическую обстановку, резко снижало заболеваемость скота лейкозом в первые 2–3 года. Однако ликвидировать заболевание было невозможно, так как в стаде всегда оставались инфицированные животные.

Наряду с такими попытками борьбы с лейкозом, в тот период времени следует особенно отметить и негативную деятельность ветеринарной науки и практики. Так, не зная вирусной этиологии лейкоза, реализацию племенного молодняка осуществляли на основании гематологических исследований, т.е. без учета их инфицирования вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Поэтому инфицированных животных (серопозитивных) отправляли в другие регионы страны, тем самым распространяя ВЛКРС по всей территории страны.

С начала 70-х годов наряду с перечисленными методами диагностики и мерами борьбы начали использовать генеалогический анализ стада для выявления предрасположенных к заболеванию животных. Однако при анализе большого фактического материала не оказалось убедительных данных об эффективности борьбы с лейкозом с использованием методов селекции скота.

За время изучения злокачественных опухолей и лейкоза было предложено более 20 гипотез и теорий их возник-

новения. Одни из них исчезли сразу же после зарождения, другие находили временное признание, третьи, несмотря на глубокую обоснованность, новизну, смелость мысли, необъективно оценивались современниками и долго не находили признания.

Так, высказывания Борреля (1903) о роли вируса в происхождении опухолей и экспериментальные работы Элермана, Бинга (1908), Payса (1911), подтверждающие возможную вирусную природу лейкоза и саркомы, были признаны лишь в 60-х годах XX столетия. Широкое и углубленное исследование лейкоза крупного рогатого скота началось во второй половине XX столетия. В изучении его достигнуты значительные успехи.

Неясность и разноплановость изучения этиологии заболевания привели к многообразию выдвинутых теорий происхождения лейкозов и опухолей. Среди них необходимо выделить следующие: теория хронического раздражения (Вирхов, 1839), эмбриональная (Конгейм, 1877), генетическая (Хартенштейн, 1897), вирусная (Эллерман, Банг, Payс, 1908–1911), физическая (Клунет, 1910), химическая (Темагива, Ихикава, 1918), гормональная (Лакасагне, 1932), вирусо-генетическая (Зильбер, 1968).

Изучение лейкоза у человека и животных проходило параллельно с изучением злокачественных опухолей. Сравнительное изучение показало много сходных черт в их возникновении и развитии.

Основным свойством, объединяющим эти два заболевания, является общая закономерность превращения нормальной клетки в опухолевую или лейкозную. Лейкозным разрастаниям, как и другим опухолям, свойственны черты автономности. Это дало основание считать лейкоз заболеванием опухолевой природы.

**Эпизоотология.** Лейкозы животных относятся к числу наиболее распространенных болезней, которые встречаются во всех странах мира. Приводимые ранее данные по распространенности лейкоза крупного рогатого скота, основанные на результатах клинико-гематологической диагностики болезни, не могли служить основой для достоверной оценки эпизоотической ситуации.

Выяснение эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота, как в стране, так и в отдельных ее регионах, необходимо для определения распространенности данной болезни и инфекции, выработки системы, плана оздоровительных мероприятий, которые должны привести к оздоровлению неблагополучных хозяйств от данной болезни.

В настоящее время накоплено значительное количество фактов, наблюдений и экспериментальных данных, свидетельствующих о широком распространении лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации. В России лейкоз крупного рогатого скота прочно занимает первое место среди инфекционных болезней крупного рогатого скота, на него приходилось в разные годы от 45 до 65% учтенных случаев инфекционных патологий.

Негативная динамика развития ситуации вызывает серьезную тревогу, тем более что увеличение числа больных и инфицированных вирусом лейкоза животных происходит на фоне резкого сокращения численности скота. Болезнь приняла в нашей стране характер эпизоотии и получила практически повсеместное распространение.

Лейкоз крупного рогатого скота причиняет значительные убытки, но главный ущерб наносится селекции и выращиванию ценных чистопородных высокопродуктивных животных. Из-за ограничений по лейкозу КРС племенные

хозяйства не могут реализовывать ценных в генетическом отношении бычков и телочек, по существу они превращаются в товарных производителей молока.

Во всех субъектах Российской Федерации с целью выявления инфицированных вирусом лейкоза животных в плановом порядке проводится серологический скрининг, результаты которого дают основание сделать вывод о практически повсеместном распространении вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС).

По официальным данным, в Российской Федерации в 2019 году зарегистрировано 1497 пунктов, неблагополучных по лейкозу крупного рогатого скота, где уровень инфицированности составляет от 12 до 15% (в отдельных субъектах РФ значительно выше), а заболеваемости — 3–4%. Такая эпизоотическая ситуация сохраняется уже в течение нескольких лет.

Эпизоотическое неблагополучие по лейкозу крупного рогатого скота регистрируется во всем мире. Наиболее интенсивно заболевание регистрируется на Американском континенте, в Австралии, Африке и Азии. По данным Службы инспекции здоровья животных и растений Министерства сельского хозяйства США (APHIS), в 89,0% молочных хозяйств и в 38% хозяйств по производству говядины США имеются серопозитивные животные. Причем в 74,8% молочных хозяйств оценочная распространенность вируса лейкоза крупного рогатого скота внутри стад составляет 25% или выше.

На основании проведенного филогenetического анализа выявлено доминирование на территории РФ IV генотипа (или «европейская» группа) вируса, что подтверждает длительную циркуляцию варианта ВЛКРС, ввезённого из стран Европы с инфицированным крупным рогатым скотом после

Второй мировой войны в результате проведения международных торговых операций, например в рамках Совета по экономической взаимопомощи (СЭВ) во времена Советского Союза. Таким образом, такая обширная диссеминация инфекции произошла при перемещении скота из европейских стран в другие страны, свободные от лейкоза, посредством международных торговых операций, проводимых с различными породами скота [Rodriguez S.M. et al., 2011], что, соответственно, и объясняет топографию самого диссеминированного варианта вируселя.

Сегодня ВЛКРС, индуцированный энзоотический лейкоз, с одной стороны, имеет свое распространение далеко за пределами территорий Мемеля (Клайпеда, с 1945 по 1991 гг. в составе Литовской ССР, сейчас — Литвы) и Кёнигсберга (с 1946 г. — Калининград в составе СССР, сейчас России), Восточной Пруссии, где лейкоз крупного рогатого скота был выявлен еще в 1916 году [В.П. Шишков, Л.Г. Бурба, 1977].

Например, при идентификации происхождения изолятов предполагается принадлежность к одному конкретному региону с группировкой в соответствии с местом происхождения. Вместе с тем корреляция между генетической принадлежностью вирусов и их географическим положением была продемонстрирована для многих ретровирусов, в том числе *HTLV-1* [Slattery J.P. et al., 1999], *FIV* [Reggiani F. et al., 2004] и *FeLV* [Watanabe S. et al., 2013]. Точно так же, как и наличие более одного генотипа ВЛКРС в определенных географических зонах [Camargos M.F. et al., 2007; Zhao X. et al., 2007; Polat M. et al., 2015].

Тенденция к диверсификации вируса в гомогенные генетические группы является распространенным явлением. После рассеивания вирус затем ассилируется в стаде, и постепенно по-

популяции его становятся однородными [Pluta A. et al., 2017]. Наличие таких генетических групп ВЛКРС в регионах или стадах может происходить как результат перераспределения части популяции вируса, что может подтвердить значение роли географической кластеризации при распространении ВЛКРС в связи с генетическим дрейфом [Rola-Luszczak M. et al., 2013].

Вместе с тем в мире существует и противоположная точка зрения, что распределение генотипов ВЛКРС не всегда соответствует стране происхождения при существовании общей корреляции между распространением определенного генотипа и географическим регионом [Polat M. et al., 2016, 2017; Lee E. et al., 2016].

При проведении анализа (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) помимо установления близкородственных отношений выявлена корреляция результатов анализа на основе исследования участков различных генетических локусов. Так, например, изоляты из Ярославской, Тульской, Московской областей по гену *pol* кластеризовались с международными штаммами *D00647* (Австралия), *EF065656* (США), *AF257515* (Аргентина), которые по гену *env* относятся к *GI*, *GII* генетическим вариантам ВЛКРС или так называемым «японоамериканской» и «аргентинской» группам, а животные, от которых получены данные изоляты, были приобретены из неблагополучных по лейкозу стран в результате импортных операций по ввозу племенного скота в Россию, что, несомненно, ухудшает эпизоотическую ситуацию по лейкозу.

При изучении распространения инфекционных заболеваний и разработки мер по их предотвращению и ограничению рассматривается спектр вопросов, связанных с установлением источника и путей распространения инфекции,

мониторингом появления новых вариантов патогена и прогнозом развития эпизоотии. На современном этапе возможность быстрого получения и анализа большого количества генетической информации позволяет решать традиционные задачи эпизоотологии на молекулярном уровне с использованием результатов изучения генетического полиморфизма патогена в качестве генетических маркеров инфекций.

Мониторинг новых генетических вариантов патологического агента, что, несомненно, является отражением его эволюции, необходим для совершенствования диагностики, определения источника возбудителя при экспортно-импортных операциях, а также установления взаимосвязи между инфицированием отдельными генетическими вариантами ВЛКРС и тяжестью патологического процесса, развитием клинических симптомов или гуморального иммунного ответа у хозяина [Inoue E. et al., 2011; Matsumura K. et al., 2011; Panei C.J. et al., 2013; Aida Y. et al., 2013].

Обнаружение у инфицированных особей близкородственных вариантов вируса свидетельствует о том, что эти животные были инфицированы из одного источника. Таким образом, высокая изменчивость вирусов дает возможность устанавливать эпизоотологическую связь между инфицированными животными на основании анализа филогенетических отношений между инфицирующими их вариантами вируса: чем ближе эволюционные отношения между вариантами вируса, тем, в общем случае, ближе эпизоотологическая связь между особями, от которых они были получены. Этот принцип молекулярной эпизоотологии применяется при установлении источника заражения животного для доказательства эпизоотологической связи между донорами и реципиентами вируса.

**Этиология.** ВЛКРС относится к семейству РНК-содержащих вирусов семейства *Retroviridae*, роду *Deltaretrovirus*, к которому принадлежат также Т-лимфотропные вирусы приматов (*PTLV*, *STLV*), человека (*HTLV*).

Ретровирусы на сегодняшний день являются важными патогенами как для человека, так и для многих видов животных. Семейство данных вирусов отличается наличием уникального этапа в процессе репликативного цикла — обратной транскрипции, опосредованного ферментом обратной транскриптазой — РНК-зависимой ДНК-полимеразой, которую кодирует ген *pol* в составе генома ретровирусов [Gerald G. et al., 1980; Kettmann R. et al., 1994].

Как и все представители ретровирусов, *BLV* использует механизм обратной транскрипции для копирования вирусной РНК в комплементарную ДНК, которая затем вставляется в хромосомную ДНК хозяина в качестве провируса.

Для ВЛКРС также характерна пожизненная персистенция вируса в организме животного, так же как и при ВИЧ-инфекции у человека и у инфицированных животных вирусом иммунодефицита.

В соответствии со способом передачи ретровирусы подразделяются на экзогенные ретровирусы и эндогенные ретровирусы. И если экзогенные варианты вирусов передаются между их хозяевами горизонтально, то эндогенные вирусы возникают в результате инфицирования первичных половых клеток и затем передаются вертикально от родителей их потомству [2КР].

Эндогенные ретровирусы в ходе миллионов лет эволюции каждого вида животных постепенно накапливались в их геноме. Если рассматривать наиболее полно изученный геном человека, то в его составе доля эндогенных ретровирусов равна ~8%.

Все виды вирусов, входящих в род *Deltaretrovirus*, считаются экзогенными, с горизонтальной передачей, но недавние исследования показали наличие эндогенного дельтагартровируса в геноме длиннопалых летучих мышей, что подтверждает принципиальную возможность существования эндогенных форм.

В молекулярной диагностике используют наиболее консервативные области генома вируса лейкоза, расположенные в генах *gag*, *pol*, *env*. Филогенетическое сравнение разных штаммов по гену *pol* в качестве стандарта показало, что различие между ВЛКРС и Т-лимфотропным вирусом приматов (*PTLV*) по нуклеотидной последовательности составляет 42% [Gillet N. et al., 2007; Dube S. et al., 2000, 2009]. Таким образом, ВЛКРС формирует отдельную филогенетическую ветвь внутри семейства ретровирусов. Внутри подгруппы ВЛКРС расхождения в нуклеотидных последовательностях составляют менее 6% для генов *pol* и *env*, что свидетельствует о высокой степени консерватизма штаммов вируса из различных географических регионов мира [Gillet N. et al., 2007]. Несмотря на то, что причины консерватизма неизвестны, такая стабильность генома может быть результатом высокой точности прохождения процесса обратной транскрипции или строгого ограничения условий репликации [Gillet N. et al., 2007].

При этом для многих РНК-содержащих вирусов, включая ВЛКРС, ВИЧ-1, вирусы гриппа и др., характерна высокая скорость эволюции, превышающая для наиболее изменчивых участков генома 1% в год. В случае ВЛКРС в процессе проведения молекулярно-эпизоологического анализа исследуются генетические последовательности области поверхности гликопротеида *gp51* ВЛКРС, что связано со значительной изменчивостью этого участка генома вируса.

Нуклеотидные мутации на анализируемых участках-мишениях генома возбудителя оказывают потенциальное влияние вирусной изменчивости на результаты диагностических тестов, что, несомненно, необходимо учитывать при разработке диагностических и профилактических препаратов.

Ген *env* кодирует белок *gp51* оболочки и трансмембранный гликопротеин *gp30*, необходимых для вирусной инфекционности и при иммунном ответе организма посредством выработки антител [Gillet N. et al., 2007]. Вследствие важных биологических функций и его локализации на вирусной поверхности участок гена *env*, кодирующий гликопротеин *gp51*, является основным предметом филогенетического анализа [Polat M. et al., 2017]. Многие исследования показали значительную консервативность последовательности *gp51* в штаммах из нескольких географических мест [Camargos M.F. et al., 2002, 2007], а найденные небольшие различия представлены в основном точечными мутациями [Beier D. et al., 2001; Mamoun R.Z. et al., 1990]. Некоторые из этих мутаций приводят к различиям сайтов рестрикции, что позволяет классифицировать ВЛКРС по различным генотипам, используя такие методы, как *RFLP* анализ [Licursi M. et al., 2003; Fechner H. et al., 1997]. Филогенетические исследования, которые в основном проводятся на основе частичных или полных последовательностей гена *env*, показали, что изоляты могут кластеризоваться в отдельные генотипы. На сегодняшний день в мире выявлено 11 генетических вариантов ВЛКРС [Polat M. et al., 2016, 2017; Pluta A. et al., 2017; Rola-Łuszczak M. et al., 2013; Lee et al., 2015, 2016; Licursi M., 2003; Донников И.М. и соавт., 2014; Вафин Р.Р. и соавт., 2013; Рузина М.Н. и соавт., 2012; Лиманский, А.П. и соавт., 2004; Yu C. et

al., 2019]. При этом некоторые исследования выделяют внутри генотипов G4, G6 и G7 различные подгруппы [Pluta A. et al., 2017; Rola-Łuszczak M. et al. 2013; Polat M. et al., 2015; Gautam S. et al., 2018].

Глобальное генетическое разнообразие ВЛКРС в настоящее время является актуальной темой, несмотря на то, что вариация среди генотипов низкая. На основании биоинформационического анализа 256 нуклеотидных последовательностей (длиной >500 н.) гена из международного генетического банка данных GenBank ресурса NCBI (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA), кодирующего гликопротеид *gp51*, были идентифицированы детерминанты/клеточные эпитопы В-клеток и Т-клеток и проведено сравнение этих последовательностей, что, несомненно, будет полезно при разработке эффективной вакцины против ВЛКРС и выяснения механизмов феномена «ухода» от иммунной системы организма хозяина при вирусной стратегии [Pluta A. et al., 2018].

Ген *pol* — наиболее консервативный в составе генома ВЛКРС. Результаты экспериментов показали, что вариабельность изученного ранее участка гена *pol* ВЛКРС не превышала 3%. Анализ последовательностей изученного участка позволил разработать тест-систему и использовать её для диагностики ВЛКРС-инфекции у крупного рогатого скота как на территории РФ, так и ввозимого из зарубежных стран.

С одной стороны, ген *env* ВЛКРС проявляет относительно высокую степень консерватизма среди различных штаммов в целом, что является отличительной особенностью вирусов, принадлежащих к роду дельтаретровирусы [Mamoun R.Z. et al., 1990; Slattery J.P. et al., 1999; Watanabe S. et al., 2013]. С другой стороны, ген *env* представляет

собой изменчивый участок генома ВЛКРС. Большинство работ по полиморфизму ВЛКРС и классификация его генетических вариантов основаны на определении первичной нуклеотидной последовательности гена *env* методом секвенирования. Данный ген кодирует гликопротеиды, поверхностный *gp51* и трансмембранный *gp30*, которые являются мишенью для нейтрализующих антител и играют ключевую роль в жизненном цикле вируса, отвечая за тропизм к клеткам, проникновение вируса, участвуют в индукции слияния клеток и образовании синцитиев. Нарушение репликации *in vivo* и увеличение скорости развития болезни могут быть вызваны мутацией, затронувшей только один кодон гена *env*. В результате чего наиболее высокая степень генетической изменчивости целевого гена *env* послужила основой для создания классификации генотипов возбудителя, а сравнение аминокислотных последовательностей необходимо для идентификации различий в клеточных эпитопах, что в свою очередь отражается на разработке средств специфической профилактики заболевания (серологические, молекулярные диагностикумы, вакцина) и особенностях биологии данного возбудителя.

**Патогенез.** Главным и практически единственным резервуаром для вируса лейкоза крупного рогатого скота является домашний крупный рогатый скот. В дикой природе *BLV* также выявляется у некоторых представителей подсемейства Бычьих (*Bovinae*).

Источником возбудителя болезни являются животные, зараженные ВЛКРС, и животные с изменениями крови, характерными для лейкоза. Последние представляют особую опасность в распространении инфекции. Появление и распространение лейкоза в ранее благополучных хозяйствах связано с

завозом животных из неблагополучных по этому заболеванию мест и зон. Совместное содержание больных или зараженных ВЛКРС животных со здоровыми ведет к постоянному увеличению в стаде серопозитивных животных.

ВЛКРС является экзогенным ретровирусом для всех исследованных видов животных и передается только через живые соматические клетки (лимфоциты), содержащие провирусную ДНК. Существуют следующие способы передачи ВЛКРС:

- контактный;
- трансплацентарный (внутриутробный);
- ятрогенный;
- кровососущими насекомыми.

В естественных условиях распространение инфекции чаще всего происходит с клетками крови, при этом пороговая доза для воспроизведения инфекции составляет 2,5–3,0 тыс. лейкоцитов.

Передача *BLV* восприимчивому крупному рогатому скоту может осуществляться через кровь, а также всеми секретами и экскретами при попадании в них лимфоцитов, зараженных вирусом. Здоровые животные заражаются от инфицированных ВЛКРС животных при контакте в скотных дворах, выгульных площадках, родильных отделениях, на пастбищах, а также при несоблюдении правил асептики при ветеринарных и зоотехнических операциях (взятие крови, введение лекарственных препаратов, вакцин, сывороток, удаление рогов, мечение, трансплантация эмбрионов, искусственное осеменение, родовспоможение, ректальное исследование), при скармливании необеззараженного сборного молока, при доении коров. Факторами передачи вируса могут стать любые биологические жидкости (кровь, молоко и проч.), содержащие инфицированные лимфоциты.

Анализ данных о роли молока как фактора передачи *BLV* показал, что в естественных условиях заражение телят вирусом лейкоза этим путем происходит весьма редко. Однако вероятность передачи вируса с молоком значительно возрастает при контаминации кровью, например в случае заболевания коровы-вирусоносителя маститом.

Проблема передачи ретровирусов с молоком от инфицированной матери её потомству существует не только для *BLV*, но и для представляющих значительную опасность Т-лимфотропных вирусов приматов и вируса иммунодефицита человека. Исходя из сходства биологических свойств этих вирусов, следует ожидать, что способ и механизмы их передачи имеют много общего.

В последнее время данная проблема приобрела новый импульс, поскольку стали известны многочисленные факты передачи экзогенных ретровирусов хозяевам других видов. Однако с этой точки зрения *BLV* имеет некоторые особенности. Если многочисленные Т-лимфотропные вирусы человека и обезьян, объединенные в настоящее время в группу PTLV — лимфотропных вирусов приматов, очень близки, то *BLV* формирует отдельную филогенетическую ветвь, отличаясь от PTLV по нуклеотидной последовательности наиболее консервативного гена *rol* на 42%, и, за исключением домашнего крупного рогатого скота (*Bos taurus*), не обнаружен ни среди ныне существующих, ни ископаемых представителей рода *Bos*.

Проблема лейкоза крупного рогатого скота имеет непосредственное отношение к безопасности здоровья человека. Несмотря на то, что случаев естественного инфицирования человека ВЛКРС не выявлено, не исключается вероятность рекомбинации между ВЛКРС и HTLV, что может привести к появлению

нию онкогенных свойств вируса, опасных для человека.

Вирус может размножаться в культурах клеток крупного рогатого скота, ряда других млекопитающих, в том числе человека. По своей генетической структуре вирус содержит все гены, присущие семейству HTLV, включая ген *tax*, который обладает трансактивирующими, трансформирующими функциями и является онкогеном. *BLV* может представлять собой реальный риск для развития онкологических болезней у человека.

Вместе с тем одним из важнейших аспектов изучения биологических свойств ВЛКРС является потенциальная способность вируса поражать ксеногенные виды животных, в том числе и человека, употребляющего в пищу продукты животноводства и тесно контактирующего с крупным рогатым скотом в процессе хозяйственной деятельности.

Долгое время считалось, что лейкоз крупного рогатого скота не является инфекционно опасным для человека. Однако большинство всех исследований, проводимых у людей, основывались на предположении, что превалирующим местом локализации вируса *BLV* является лимфоидная ткань, и исследованиям подвергали только образцы крови. Расширение области поиска на другие виды тканей человека привело к получению принципиально других результатов. Исследование архивных проб тканей молочной железы, полученных от 239 доноров, показали, что ДНК провируса лейкоза крупного рогатого встречается в эпителии молочной железы у женщин в 29% случаев. При этом в случае заболеваемости раком молочной железы встречаемость ДНК *BLV* была достоверно выше и составляла 59%.

Получены свидетельства потенциальной опасности *BLV* для человека.

При исследовании методом иммуно-блоттинга сывороток крови 257 человек в 74% случаев были выявлены антитела против капсидного антигена *BLV* (p24), что может служить свидетельством широкого распространения контактов людей с *BLV*, но не обязательно означает их инфицирование [11]. Выявление участков генома *BLV* и белка p24 в образцах тканей и культурах клеток молочной железы коров и человека доказывает, что *BLV* обладает тропизмом к клеткам этих тканей, в частности к эпителию [8, 9, 12]. Нельзя также исключить и продукцию *BLV* тканями молочной железы, а не только присутствие ДНК провируса в лимфоцитах крови, содержащихся в молоке, как это принято считать. Поэтому проблема передачи *BLV* человеку вследствие тесного контакта и употребления в пищу продуктов животноводства остается актуальной.

Высокий процент встречаемости *BLV* в образцах тканей человека указывает на необходимость дальнейших исследований механизмов передачи вируса и его биологии.

Наиболее вероятный путь проникновения *BLV* в организм человека — алиментарный. Возможность перехода межвидового барьера для *BLV* в экспериментах была доказана для кроликов, овец и коз [1].

Устойчивость ВЛКРС во внешней среде невысокая. Вирус термолабильный, т.е. чувствителен к температурным воздействиям. Разрушается при нагревании до 56°C в течение 30 минут. Полная инактивация вируса в молоке или вируссодержащей жидкости происходит при 60°C за 1 минуту, а при температуре 70–74°C — за 17 секунд. Вирус не обнаруживают в молоке уже через 24–48 часов при температуре 9–15°C. В жидком азоте инфекционность вируса сохраняется несколько лет.

Установлено, что лейкозный процесс у крупного рогатого скота проходит по четырем сменяющимся периодам:

- инкубационная стадия — с момента заражения ВЛКРС до появления антител к вирусу лейкоза;
- стадия бессимптомной инфекции
- от момента появления антител до обнаружения гематологических изменений;
- гематологическая стадия, характерным показателем которой является персистентный лимфоцитоз;
- стадия опухолевого проявления с разрастанием злокачественных опухолей в тканях кроветворных и других органов.

Патогенетическая сущность инфекции ВЛКРС чаще всего проявляется в бессимптомном течении болезни. Животных, находящихся в этой стадии, определяют с помощью иммунологических реакций путем обнаружения в сыворотке крови специфических антител к антигену ВЛКРС. Состояние антителоносительства не вызывает у животных видимых физиологических или патологических отклонений. В частности, у коров не наблюдается нарушений воспроизводительной функции и деятельности молочной железы, приросты массы молодняка соответствуют кормовым рационам, полностью сохраняются поведенческие рефлексы. В состоянии вирусоносительства животные могут находиться на протяжении всей своей жизни. Только у незначительной части животных-антителоносителей выявляют особей с клинико-гематологическими изменениями, характерными для лейкоза.

**Клинические признаки.** Наиболее часто при лимфолейкозе крупного рогатого скота обнаруживают увеличение поверхностных лимфатических узлов — околоушных, подчелюстных, надвыменных, коленной складки. При ректальном

исследовании обнаруживают увеличение лимфатических узлов тазовой полости, глубоких паховых. Редко отмечают экзофтальмию. У павших или убитых животных при лейкозе крупного рогатого скота обращают внимание на величину органов, распространенность опухолевых разрастаний. При лимфоидном лейкозе селезенка, как правило, увеличена в объеме, размеры ее достигают более метра в длину и 20–35 см в ширину.

**Патологоанатомические изменения.** Длительное время в СССР использовалась классификация гемобластозов крупного рогатого скота, предложенная сотрудницей ВИЭВ, д-ром вет. наук Т.П. Кудрявцевой (1967, 1980). Данная классификация позволяла выделить все основные формы и варианты гемобластозов, распределаемых в соответствии со степенью дифференцировки кроветворных клеток. Согласно классификации Т.П. Кудрявцевой были выделены следующие формы лейкоза: лимфоидный, миелоидный, гемоцитобластоз, лимфосаркома, системный ретикулез и лимфогрануломатоз.

Однако в начале 1970-х годов прошлого столетия была предложена новая система кроветворения, предложенная И.А. Чертковым и А.И. Воробьевым (1973). Авторы экспериментально доказали существование единой полипotentной стволовой клетки для всех ростков кроветворения.

#### *Гистологический метод исследования.*

Сущность метода заключается в обнаружении у больных лейкозом животных диффузных или очаговых разрастаний (пролифератов) из размножающихся, преимущественно нарушивших нормальное созревание и дифференцировку кроветворных клеток как в органах кроветворения (костный мозг, селезенка, лимфатические узлы), так и в соединительной ткани других органов.

Для исследования вырезают кусочки селезенки, лимфатических узлов, грудной кости, печени, почки, легких, сердца, органов пищеварения, в случае их поражения, матки и скелетных мышц толщиной 0,5–1 см, площадью 3–4 см<sup>2</sup>.

Вырезают кусочек так, чтобы рядом с измененной тканью были участки нормальной ткани.

Отобранные пробы органов и тканей фиксируют в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. Объем фиксирующего раствора должен в 10 раз превышать объем патологического материала; фиксирующий раствор через 24 часа заменяют свежим. Из патматериала готовят срезы и окрашивают их согласно утвержденной методике.

**Проведение исследования.** Приготовленные срезы просматривают под микроскопом и определяют общую структуру исследуемых органов с учетом изменения ткани в отдельных ее участках в результате пролиферации клеток (состояние фолликулов, межфолликулярных зон в селезенке и лимфатических узлах, присутствие клеток в просвете и вокруг сосудов, паренхиме, интерстиции органов и пр.). Выявляют детали изменений, обращая внимание на характер клеток пролиферата (тип, степень дифференцировки, зрелость) и интенсивность (выраженность) патологических изменений. Одновременно определяют наличие сопутствующих заболеваний нелейкозного характера с целью проведения дифференциальной диагностики или признаков, отягощающих основное заболевание (отеки, воспаления, дистрофии, некрозы, кровоизлияния и пр. в скелетной мускулатуре, сердце, печени, почках и других органах).

**Оценка результатов гистологического исследования.** При лимфоидном лейкозе в селезенке и лимфатических узлах наблюдают стирание рисунка за счет диффузных пролифератов из но-

вообразованных клеток лимфоидного ряда в паракортикальной пульпе и синусах лимфоузлов и межфолликулярных пространствах селезенки.

В костном мозге строма сохранена, выявляют значительное истончение и рассасывание балок, скопление клеток лимфоидного ряда, располагающихся в виде очагов или диффузно, заполняя все костномозговое пространство (лимфоидная метаплазия).

В почках, печени, сердце, сицуге и других органах новообразованные клетки лимфоидного ряда образуют очаговые скопления или располагаются диффузно между клетками паренхимы органов, в просветах капилляров; отмечают инфильтрацию ими интерстициальной ткани органов. В зависимости от степени зрелости клеток лимфоидного ряда, составляющих пролифераты и инфильтраты, различают лимфоцитарный, пролимфоцитарный и лимфобластный варианты лимфоидного лейкоза.

При недифференцированной форме лейкоза (гемоцитобластоз) в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и других органах наблюдают очаговые и диффузные пролифераты, клеточный состав которых в основном представлен клетками типа гемоцитобlasta; отмечают также клетки лимфоидного ряда различной степени зрелости.

При гистоцитарном лейкозе (недифференцированный лейкоз, системный ретикулез) размножение новообразованных клеток происходит в паракортикальной пульпе и синусах лимфоузлов, в селезенке — красной пульпе (в межмолекулярных пространствах). В других органах и тканях эти клетки обнаруживают в виде очаговых скоплений или диффузно расположенных между клетками паренхимы. Клеточный состав таких пролифератов и скоплений представлен полиморфными клетками, входящими в систему мононуклеарных

макрофагов, гистиоцитами, клетками лимфоидного ряда.

При миелоидном лейкозе (встречается крайне редко) в селезенке обнаруживают клетки гранулоцитарного ряда, мегакариоциты и клетки типа гемоцитобластов, выявляют распад и фрагментацию аргирофильных волокон. В костном мозге — скопление клеток гранулоцитарного ряда различной степени зрелости; в лимфатических узлах, печени, почках, легких и других органах наблюдают очаговые и диффузные скопления клеток миелоидного ряда.

При лимфосаркоме в лимфатических узлах, органах пищеварения, воспроизведения, сердечной и скелетной мускулатуре, других органах и тканях отмечают диффузные и очаговые пролифераты клеток лимфоидного ряда. В зависимости от преобладания определенного типа клеток различают лимфоцитарные, пролимфоцитарные, лимфобластные и плазмоцитарные варианты лимфосаркомы. При лимфосаркоме в селезенке и костном мозге изменений опухолевого характера не обнаруживают. Гистоцитарная саркома отличается от лимфосаркомы по морфологической картине клеточного состава пролифераторов, которые состоят в основном из гистиоцитов и других мононуклеарных макрофагов, отмечают также значительное количество атипичных многоядерных форм этих клеток. В костном мозге и селезенке изменений опухолевого характера не отмечают.

При лимфогрануломатозе выявляют изменения опухолевого и воспалительного характера. Обнаруживают лимфоидноклеточные и полиморфноклеточные пролифераты, склеротические изменения, некрозы в лимфатических узлах, селезенке, печени и других органах. Костный мозг почти всегда остается интактным. Клеточный состав пролифераторов при лимфогрануломатозе

представлен лимфоидными клетками различной степени зрелости, плазматическими клетками, эозинофилами, нейтрофилами, фибробластами и патогномоничными для этой формы лейкоза многоядерными гигантскими клетками Березовского–Штернберга.

При всех формах лейкоза отмечают очаговые или диффузные разрастания серо-белого или серо-розового цвета в печени, почках, в сердечной мышце, органах пищеварения, матке, скелетной мускулатуре и других органах в случае ее поражения.

При лейкозе вовлекаются в патологический процесс практически все лимфатические узлы. При вскрытии трупов и послеубийной экспертизе туш и органов отмечают симметричное увеличение лимфатических узлов, которые у отдельных животных достигают размеров  $16 \times 6$  см (предлопаточные),  $12 \times 7$  (коленной складки),  $20 \times 10$  см (надвывеменные). При лимфолейкозе они увеличены равномерно, не сращены с окружающими тканями, на разрезе узлы серо-белого цвета, сочные и саловидные. Значительно чаще отмечается поражение лимфатических узлов тазовой полости.

Селезенка увеличена при всех случаях системного лейкоза и в 40–60% случаев лимфогранулематоза. Значительное увеличение селезенки наблюдается при лимфоидном и миелоидном лейкозах. Иногда она достигает размера  $100 \times 29 \times 10$  см и массы 20–30 и даже 50 кг. В начальной стадии структура органа сохранена. Края селезенки закруглены, капсула гладкая, блестящая, напряженная, фолликулы гиперплазированы. Иногда отмечают разрывы селезенки.

При опухолевых формах лейкоза отмечают очаговые или диффузные разрастания серо-белого или серо-розового цвета в печени, почках, в сердечной мышце,

органах пищеварения (в 90% случаев отмечают патологоанатомические изменения в сычуге), матке, скелетной мускулатуре, диафрагме и других органах.

Наиболее распространенные формы заболевания у крупного рогатого скота — лимфоидный лейкоз и лимфосаркома. Реже встречается лимфогранулематоз и очень редко другие формы болезни.

При первичной постановке диагноза и для дифференциации опухолей проводят гистологические исследования.

Лейкозы — системные поражения органов кроветворения, включающие лимфоидную, миелоидную, моноцитарную и недифференцированную формы.

Гематосаркомы сопровождаются опухолевым ростом. К ним относятся лимфосаркома, ретикулосаркома, лимфогрануломатоз и миелолейкоз.

Первая отличается системностью поражения кроветворной и лимфоидной тканей с вовлечением в процесс костного мозга, селезенки и лимфатических узлов. Болезни второй группы характеризуются поражением лимфоидной ткани, то есть лимфоузлов и селезенки. Опухоли, состоящие из клеточных элементов, природу которых трудно установить, относятся к числу недифференцированных лейкозов. По данным литературы, у крупного рогатого скота наибольшее распространение имеет лимфоидный лейкоз.

В ВИЭВ испытывался предложенный А.С. Троицкой метод прижизненной диагностики лейкозов крупного рогатого скота путем обнаружения глобоидных телец в толстой капле крови. Они выявлены у 82% больных и у 21% здоровых животных. Изучалась роль этих микрорганизмов в этиопатогенезе лейкозов.

**Диагностика.** При возникновении подозрения на лейкоз ветеринарными специалистами должен проводиться отбор проб биологического и (или) патологического материала.

От животных должны отбираться:

- кровь для серологических исследований в объеме 5–7 мл без антикоагулянта или с фактором свертывания крови (от животных старше 6 месяцев);
- кровь для гематологических исследований в объеме 5–7 мл с антикоагулянтом 10%-ным раствором динатриевой соли этилендиаминетрауксусной кислоты (далее – ЭДТА) из расчета 0,02 мл на 1 мл (от животных старше 6 месяцев, давших положительный результат при серологических исследованиях);
- кровь для молекулярно-биологических исследований методом полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) в объеме 5–7 мл с антикоагулянтом 3-процентным раствором ЭДТА (в соотношении 10:1) или с цитратом натрия (от животных с 10-дневного возраста и старше);
- молоко для исследования в ИФА или ПЦР в объеме 10–20 мл, не позднее 1–2 часов с момента отбора или прошедшее пробоподготовку согласно инструкции по постановке данных реакций;
- от трупов животных должны отбираться кусочки селезенки, лимфатических узлов, грудной кости, печени, почки, легких, сердца, органов пищеварения (в случае их поражения), матки и скелетных мышц толщиной  $2 \times 2 \times 1$  см, площадью 4 см<sup>2</sup>. Патологический материал отбирается в случае, если с момента гибели или убоя животного прошло не более 8 часов. Пробы патологического материала должны быть помещены в емкость с герметично закрывающейся крышкой и законсервированы фиксирующим раствором (10% формалин в соотношении 1:30). При отсутствии возможности для консервации фиксирующим раствором пробы патологического материала должны быть доставлены в лабораторию не позднее 6 часов с момента отбора. Пробы биологического/

патологического материала доставляются с соблюдением правил асептики и антисептики.

Лабораторные исследования проб биологического и (или) патологического материала должны проводиться с использованием:

- серологических методов исследований: РИД и (или) ИФА;
- гематологического метода;
- метода ПЦР;
- гистологических исследований.

Диагноз считается установленным в одном из следующих случаев:

- получен положительный результат при гематологическом исследовании;
- получен положительный результат при гистологическом исследовании (обнаружены патоморфологические изменения в органах и тканях, характерные для лейкоза).

При обнаружении у животных старше 6 месяцев антител к возбудителю, выявленных при проведении серологических методов исследования, или при обнаружении генетического материала возбудителя в крови методом ПЦР, при отрицательных результатах гематологических исследований и отсутствии клинических и патоморфологических признаков болезни, животное считается инфицированным.

Инфицированное животное считают больным лейкозом при получении положительных результатов гематологических исследований и (или) выявлении характерных для лейкоза клинических и патоморфологических признаков.

**Специфическая профилактика.** Безусловно, первоочередной задачей сейчас является ликвидация лейкоза крупного рогатого скота и недопущение распространения его на территории Российской Федерации.

Поскольку до настоящего времени в нашей стране и за рубежом в арсенале

практической ветеринарии отсутствуют средства специфической профилактики и лечения, весьма актуальными являются исследования по изучению нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа гена *env*. Изучение полиморфизма ВЛКРС имеет большое значение для совершенствования как молекулярно-генетической, так и серологической диагностики индуцированной ВЛКРС инфекции, а также для установления источника инфекции при экспортно-импортных операциях.

Имеются отдельные сообщения о возможности использования с целью специфической профилактики против ВЛКРС вакцины, приготовленной из вируса лейкоза. Вакцину готовили из культуральной жидкости, для инактивации вирусов использовали бинарный этилонминин. Однако использование этой вакцины не нашло широкого применения.

Положительный результат мероприятий по профилактике и ликвидации лейкоза КРС во многом зависит от своевременного выявления вирусонасителей. И результат, в свою очередь, обусловлен выполнением следующих условий: наличием объективных знаний об особенностях проявления инфекционного процесса на различных стадиях его развития, чувствительных и специфичных средств и методов диагностики, а также правильным определением места каждого из диагностических методов в системе мер борьбы.

Вместе с тем особенно следует отметить, что залогом успеха в ликвидации инфекции ВЛКРС во многих оздоровленных хозяйствах послужили:

- четкое понимание руководителями и специалистами важности и необходимости создания здорового стада;
- комплексный подход и взаимодействие ветеринарной, зоотехнической и племенной служб в выполнении пра-

вил по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота;

- достоверная диагностика с использованием серологических (РИД, ИФА), молекулярно-генетических (ПЦР), гематологических и патоморфологических методов;

- приобретение животных из благополучных хозяйств, районов, стран, имеющих отрицательный результат после серологических исследований в РИД или ИФА;

- карантинирование вновь поступивших животных в течение 30 дней и обязательное исследование их на лейкоз серологическими методами;

- ввозимое импортное поголовье КРС разрешается содержать только на благополучных по лейкозу фермах, в изоляции от местного поголовья в течение 12 месяцев.

## Литература

1. Kabeya H., Ohashi K., Onuma M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 2001; 63: 703–708.
2. Gerald G., Grangene D. Retrovirus reverse transcriptase. *Molecular Biology of RNA tumor viruses*. J. Stephenson (Ed). N.-Y: Academic Press. 1980; 346–394.
3. Kettmann R., Burny A. Bovine Leukemia Virus. In: *The Retroviridae*. J.A. Levy (Ed). N.-Y: Plenum Press. 1994; 3: 39–81.
4. Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A.-B., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Kettmann R., Willems L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *J. Retrovirol.: electronic journal.* 2007; 4: 32. URL: <http://www.retrovirology.com/content/4/1/18.pdf>. DOI: 10.1186/1742-4690-4-18.

5. Dube S., Dolcini G., Abbott L., Mehta S., Dube D., Gutierrez S., Ceriani C., Esteban E., Ferrer J., Poiesz B. The complete genomic sequence of a *BLV* strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology*. 2000; 277: 379–386.
6. Dube S., Abbott L., D.K. Dube, G. Dolcini, S. Gutierrez, C. Ceriani, M. Juliarena, J. Ferrer, R. Perzova, B. J. Poiesz. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *J. Virol.: electronic journal*. 2009; 6: 11. URL: <http://www.virologyj.com/content/6/1/120.pdf> (дата обращения: 11.10.2009). DOI:10.1186/1743-422X-6-120.
7. Polat M., Takeshima S.N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol. J.* 2017; 14: 209. DOI:10.1186/s12985-017-0876-4.
8. Camargos M.F., Stancek D., Rocha M.A., Lessa L.M., Reis J.K., Leite R.C. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2002; 49: 325–331.
9. Camargos M.F., Pereda A., Stancek D., Rocha M.A., dos Reis J.K., Greiser-Wilke I., Leite R.C. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus. *Virus Genes.* 2007; 34: 343–350.
10. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFL-PA and DNA sequencing. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift.* 2001; 114(7–8): 252–256.
11. Mamoun R.Z., Morisson M., Rebeyrotte N., Busetta B., Couez D., Kettmann R., Hospital M., Guillemain B. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.* 1990; 64(9): 4180–4188.
12. Licursi M., Inoshima Y., Wu D., Yokoyama T., González E.T., Sentsui H. Proivirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol.* 2003; 96(1): 17–23.
13. Fechner H., Blankenstein P., Looman A.C., Elwert J., Geue L., Albrecht C., Kurg A., Beier D., Marquardt O., Ebner D. Pro-virus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *J. Virol.* 1997; 237(2): 261–269.
14. Polat M., Takeshima S.N., Hosomichi K., Kim J., Miyasaka T., Yamada K., Arainga M., Murakami T., Matsumoto Y., de la Barra Diaz V., Panei C.J., González E.T., Kanemaki M., Onuma M., Giovambattista G., Aida Y. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology.* 2016; 13(1): 4. DOI: 10.1186/s12977-016-0239-z.
15. Polat M., Moe H.H., Shimogiri T., Moe K.K., Takeshima S.N., Aida Y. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. *Arch. Virol.* 2017; 162(2): 425–437. DOI: 10.1007/s00705-016-3118-y.
16. Pluta A., Rola-Łuszczak M., Kubis P., Balov S., Moskalik R., Choudhury B., Kuz'mak J. Molecular characterization of bovine leukemia virus from Moldovan dairy cattle. *Arch. Virol.* 2017; 162(6): 1563–1576. DOI: 10.1007/s00705-017-3241-4.
17. Rola-Luszczak M., Pluta A., Olech M., Donnik I., Petropavlovskiy M., Gerilovich A., Vinogradova I., Choudhury B., Kuzmak J. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impactation phylogeny. *PLoS One.* 2013; 8(3). URL: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058705>.
18. Lee E., Kim E.J., Ratthanaphart J., Vitoonpong R., Kim B.H., Cho I.S., Song J.Y., Lee K.K., Shin Y.K. Molecular

- epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 41: 245–254. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.04.010.
19. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Мониторинг эпизоотической ситуации и применение молекулярно-генетической диагностики в оздоровительных мероприятиях при лейкозе крупного рогатого скота. Достижения науки и техники АПК. 2014; 1: 47–51.
20. Донник И.М., Татарчук А.Т., Петропавловский М.В., Маркарян А.Ю., Лысов А.В. Изучение молекулярно-генетической структуры вируса лейкоза крупного рогатого скота в регионе УрФО // Современные молекулярно-генетические и иммуно-физиологические подходы к ликвидации гемобластозов животных: Сборник трудов. Екатеринбург. 2014; 131–138.
21. Вафин Р.Р., Хазипов Н.З., Шаева А.Ю., Закирова З.Р., Зайнуллин Л.И., Тюлькин С.В., Абдулина И.Р., Алимов А.М. Выявление нового (8-го) генотипа ВЛКРС в различных регионах мира. Фундаментальные исследования. 2013; 10(7): 1467–1470.
22. Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Малоголовкин А.С., Клименко А.И., Разумовская В.В. Филогенетический анализ участка проприрунского гена pol изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, обнаруженных у животных из различных регионов Российской Федерации. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2011; 6: 48–51.
23. Рузина М.Н., Андрианов Б.В., Шайхаев Г.О., Сулимова Г.Е. Идентификация и классификация изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота России и Украины на основе анализа изменчивости вирунского гена pol. Генетика. 2012; 7(48): 855.
24. Лиманский А.П., Geue L., Лиманская О.Ю., Beier D. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в Украине. Вопр. вирусологии. 2004; 1(49): 39–44.
25. Yu C., Wang X., Zhou Y. et al. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. *BMC. Vet. Res.* 2019; 15(1): 179. DOI: 10.1186/s12917-019-1863-3.
26. Polat M., Ohno A., Takeshima S.N., Kim J., Kikuya M., Matsumoto Y., Mingala C.N., Onuma M., Aida Y. Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Arch. Virol.* 2015; 160: 285–296. URL: <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2280-3>.
27. Gautam S., Mishra N., Kalaiyarasu S., Jhade S.K., Sood R. Molecular characterization of bovine leukaemia virus (BLV) strains reveals existence of genotype 6 in cattle in India with evidence of a new subgenotype. *Transbound Emerging Diseases.* 2018; 65(6): 1968–1978. URL: <https://doi.org/10.1111/tbed.12979>.
28. Pluta A., Albritton L.M., Rola-Luszczak M., Kuzmak J. Computational analysis of envelope glycoproteins from diverse geographical isolates of bovine leukemia virus identifies highly conserved peptide motifs. *Retrovirology.* 2018; 15(1): 2. DOI: 10.1186/s12977-017-0383-0.
29. Inoue E., Matsumura K., Maekawa K., Nagatsuka K., Nobuta M., Hirata M., Minagawa A., Osawa Y., Okazaki K. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. *Arch. Virol.* 2011; 156: 1137–1141.
30. Matsumura K., Inoue E., Osawa Y., Okazaki K. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. *Virus Res.* 2011; 155: 343–348. URL: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.11.005>.
31. Panei C.J., Takeshima S.N., Omori T., Nunoya T., Davis W.C., Ishizaki H.,

- Matoba K., Aida Y. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Vet. Res.* 2013; 9: 95. URL: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-95>.
32. Aida Y., Murakami H., Takahashi M., Takeshima S.N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front. Microbiol.* 2013. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00328>.
33. Slattery J.P., Franchini G., Gessain A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res.* 1999; 9(6): 525–540.
34. Watanabe S., Kawamura M., Odahara Y., Anai Y., Ochi H., Nakagawa S., Endo Y., Tsujimoto H., Nishigaki K. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. *PLoS One.* 2013; 8(4): e61009. DOI:10.1371/journal.pone.0061009.
35. Belak S., Ballagi-Pordány A. Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol. Cell. Probes.* 1993; 7: 241–248. URL: <https://doi.org/10.1006/mcpr.1993.1035>.
36. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16: 111–120.
37. Rodriguez S.M., Florins A., Gillet N., de Brogniez A., Sanchez-Alcaraz M.T., Boxus M., Boulanger F., Gutierrez G., Trono K., Alvarez I., Vagnoni, L., Willems, L. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses.* 2011; 3: 1210–1248. DOI:10.3390/v3071210.
38. Лейкозы и злокачественные опухоли животных. Под ред. В.П. Шишкова, Л.Г. Бурбы. М., 1977.
39. Gatot J.S., Callebaut I., Van Lint C., Demonte' D., Kerkhofs P., Portetelle D., Burny A., Willems L., Kettmann R. Bovine leukemia virus SU protein interacts with zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo. *J. Virol.* 2002; 76(16): 7956–7967.
40. Johnston E.R., Albritton L.M., Radke K. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. *J. Virol.* 2002; 76(21): 10861–10872.
41. Правила по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. Утв. МСХиП РФ. 11 мая 1999 г., № 359.
42. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ. 23 августа 2000 г.
43. Zhao X., Buehring G.C. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology.* 2007; 366: 150–165. URL: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.058>.
44. Bazzucchi M., Iscaro C., Casciari C., Giammarioli M., Feliziani F. Molecular characterization of Italian bovine leukemia virus isolates reveals the presence of distinct phylogenetic clusters. *Arch. Virol.* 2019; 164: 1697–1703. URL: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04255-4>.
45. Willems L., Burny A., Collette D., Dangoisse O., Dequiedt F., Gatot J.S., Kerkhofs P., Lefebvre L., Merezak C., Peremans T., Portetelle D., Twizere J.C., Kettmann R. Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2000; 16(16): 1787–1795. URL: <https://doi.org/10.1089/08892220050193326>.
46. Rodriguez S.M., Golemba M.D., Campos R.H., Trono K., Jones L.R. Bo-

- vine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 2788–2797. URL: <https://doi.org/10.1099/vir.0.011791-0>.
47. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Клименко А.И., Коваленко А.В., Дробин Ю.Д., Василенко В.Н. Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте. Вопросы вирусологии. 2015; 60(5): 32–37.
48. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкина И.А. Генетический полиморфизм вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации. Российская сельскохозяйственная наука. 2016; 5: 56–59.
49. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального Федерального Округа Российской Федерации. Ветеринария Кубани. 2017; (6): 4–9.
50. Гулюкин М.И., Забережный А.Д., Юрлов К.П., Шабейкин А.А., Барабанов И.И., Степанова Т.В., Лопунов С.В. Научно-обоснованная модель противоэпизоотических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление. 2018; 1: 4–7.

# ИНФЕКЦИОННЫЙ РИНОТРАХЕИТ/ ИНФЕКЦИОННЫЙ ПУСТУЛЕЗНЫЙ ВУЛЬВОВАГИНИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Верховская А.Е., Верховский О.А., Непоклонова И.В., Глотов А.Г., Алипер Т.И.

Инфекционный ринотрахеит / инфекционный пустулезный вульвовагинит крупного рогатого скота (ИРТ/ИПВ, пузырьковая сыпь, инфекционный некротический ринит, «красный нос») — острое контагиозное вирусное заболевание, характеризующееся поражением органов дыхания, лихорадкой, конъюнктивитами, а также поражением органов репродуктивной системы: пустулезным вульвовагинитом иabortами у коров, баланопоститами у быков.

ИРТ/ИПВ является одной из главных проблем молочного и мясного животноводства, поэтому методы диагностики и профилактики данного заболевания определены стандартами Всемирной организации по охране здоровья животных (ОIE) [36].

**Этиология.** Возбудителем болезни является герпесвирус 1 типа крупного рогатого скота (ГВ-1 КРС, *Bovine herpesvirus-1, BoHV-1*), впервые выделенный в культуре клеток Медин, Йорк и Мак-Керчер в 1956 г., Ли и Бейкер — в 1957 г. [6, 26]. В нашей стране вирус впервые был выделен в 1969 году от больных телят в Тамбовской области Н.Н. Крюковым [2].

ГВ-1 КРС является ДНК-содержащим вирусом, относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, роду *Varicellovirus*. Вирионы икосаэдрической симметрии, имеют сложную структуру, включающую капсид, сердцевину, суперкапсидную структуру и липопротеиновую оболочку. Вирус устойчив к замораживанию. При минус 60...70°C сохраняется в течение 7–9 месяцев. При 4°C активность вируса снижается через 30–40 суток всего на 1 lg.

Ацетон, эфир, хлороформ и этиловый спирт инактивируют вирус немедленно [6, 14, 27, 29].

Вирион состоит из линейной ду��ечечной молекулы ДНК, кодирующющей около 70 белков, в том числе 33 структурных, 13 из которых связаны с оболочкой, 6 с нуклеокапсидом и два с ДНК. Кроме того, 11 гликопротеинов локализованы в оболочке и формируют пепломеры [9, 29].

Рестрикционный анализ ДНК позволил разделить ГВ-1 КРС на подтипы BoHV-1.1, BoHV-1.2a и BoHV-1.2b. Подтип 1.2 считается менее вирулентным, чем подтип 1.1. Подтипы BoHV-1.1 и BoHV-1.2a вызывают поражение респираторных органов, а также могут быть выделены из abortированных плодов. Подтип BoHV-1.2b чаще вызывает инфекционный пустуллярный вульвовагинит или инфекционный баланопостит. Однако развитие респираторной или генитальной формы заболевания зависит не столько от подтипа вируса, сколько от пути инфицирования животных. Все изолятты вируса иммунологически и генетически идентичны, также невозмож но различить полевые и генно-модифицированные штаммы без использования молекулярных методов [20].

Ранее известные подтипы BoHV-1.3a и BoHV-1.3b, вызывающие нейропатологию у телят, в настоящее время классифицированы как герпесвирус крупного рогатого скота 5 типа (ГВ-5 КРС, BoHV-5) [12, 24, 29, 36]. ГВ-1 и ГВ-5 генетически идентичны примерно на 82,3%. Филогенетический анализ показал различия в последовательности

гена UL27, кодирующего гликопротеин В (gB) [25].

ГВ-1 КРС может мигрировать со слизистых оболочек в ЦНС через аксоны нервных клеток внутри нервных волокон. ЦНС поражается вследствие центростремительного распространения вируса через тройничный нерв и его гассеров узел, а менингомиелит возникает при проникновении вируса по нервным окончаниям, ганглиям и корешкам в спинной мозг. Вирус сохраняется в нейронах спинномозговых ганглиев в период латентной инфекции. Латенция герпесвируса порождает ряд проблем, создающих большие трудности в борьбе с ИРТ/ИПВ. После заражения вирулентным штаммом возбудителя все животные становятся латентными носителями вируса точно так же, как и все аттенуированные (вакциные) штаммы вируса остаются в организме в латентном состоянии. Диссеминация аттенуированных штаммов в окружающую среду практически не контролируется. Вакцинация не предотвращает в организме вакцинированных животных латенции вирулентного вируса [6, 23, 32].

**Эпизоотологические данные.** Вирус ГВ-1 КРС распространен практически во всех странах мира, за исключением Африканского континента. По результатам эпизоотологического мониторинга распространения ГВ-1 КРС в мире установлено, что эпизоотическая обстановка по ИРТ/ИПВ в мире характеризуется стабильностью. При анализе эпизоотической ситуации по ИРТ на территории Европы благополучными по этому заболеванию официально признаны Норвегия, Швеция, Финляндия, Литва, Молдавия, Болгария, Греция, Словакия, Италия, Румыния и Чешская Республика [4].

Серьезный толчок к распространению болезни в 70–80-е годы XX века был дан в связи с индустриализацией животноводства и созданием крупных комплекс-

сов по выращиванию нетелей и откорму бычков, а также с завозом племенного скота. В настоящее время заболевание имеет широкое распространение в Российской Федерации и странах СНГ, носят, как правило, энзоотический характер. Серопозитивность животных равна 20–90%. В последние 10–12 лет болезнь вновь начала прогрессировать в связи с развитием высокопродуктивного молочного животноводства, строительством крупных молочных комплексов (« mega-ферм ») и фидлов, а также импортом высокопродуктивных животных из других стран [1, 2].

При попадании герпесвируса в популяцию заболеваемость скота может достигать 100%, а смертность — 20%. Основным резервуаром и источником возбудителя является крупный рогатый скот. К ГВ-1 КРС также чувствительны козы, овцы, буйволы, гаялы, яки, верблюды, ламы и свиньи. Вирус в большом количестве выделяется с носовыми, глазными и половыми секретами инфицированных животных. Наиболее чувствительны новорожденные телята до 2-недельного возраста, не получившие колостральные антитела с молоком иммунных матерей [6, 7, 9, 20].

Передача вируса происходит воздушно- капельным, алиментарным и половым путями, а также трансплацентарно.

ИРТ/ИПВ чаще болеют животные мясных пород по сравнению с молочным скотом, что связано с технологией выращивания, большей скученностью при содержании, частыми стрессами при транспортировке и перемещениях животных. В племенных хозяйствах наиболее часто наблюдаются аборты и поражение репродуктивных органов [20]. Генитальная форма чаще наблюдается у КРС молочного направления [16].

ГВ-5 распространен преимущественно в Северной и Южной Америке [16]. Однако в последнее время установлено, что

ГВ-5 активно циркулирует на территории России. Это создает теоретическую базу для интерпретации низкой эффективности вакцинопрофилактики герпес-свируской инфекции в ряде случаев [4].

**Клинические признаки.** Клинические признаки и тяжесть течения болезни зависят от штамма вируса, его вирулентности, инфицирующей дозы, способа заражения, иммунологического статуса восприимчивого животного, факторов внешней среды, в частности стресса, сопутствующих инфекций. Нередко у коров отмечают латентное течение болезни без проявления клинических симптомов.

Инкубационный период при ИРТ/ИПВ составляет от 2 до 6 дней.

Болезнь может протекать в различных формах, при которых наблюдается поражение респираторных и репродуктивных органов, abortionы, конъюнктивиты, энтериты, у новорожденных телят может протекать в виде генерализованной инфекции, поражающей органы дыхания, пищеварения, нервную и лимфатическую системы [3, 6, 20, 23, 26, 29].

При респираторной форме ИРТ/ИПВ у животных наблюдается лихорадка, ано-рексия, гиперсалivation, диспноэ, отмечается глубокий бронхиальный кашель. Обильные носовые истечения, сначала серозные, затем слизистые, приводят к образованию слизистых пробок и закупорке носовых ходов, в результате чего животные часто дышат ртом, наблюдается гиперемия и покраснение морды и носовых ходов, появляется симптом «красный нос». У животных отмечается неприятный запах при дыхании. Слизистая носа гиперемирована, с белыми некротическими очагами, образованными в результате слияния отдельных пустул, с обширными геморрагическими изъязвленными участками, покрытыми белыми дифтерическими корками. Этот симптом практически патогномоничен для респираторной формы ИРТ/ИПВ, но

его следует дифференцировать от травмирования носа посторонними предметами. При респираторном синдроме также могут наблюдаться конъюнктивиты с поражением слезных желез и слизисто-гнойные истечения из глаз. В ряде случаев обильное слезотечение и конъюнктивиты могут быть единственными клиническими проявлениями ИРТ у инфицированных животных.

Острое неосложненное течение болезни длится 5–10 дней. Летальность при отсутствии секундарной инфекции достаточно низкая, животные в основном страдают от затруднения дыхания. Однако в большинстве случаев вызванное вирусом поражение слизистой оболочки респираторного тракта приводит к осложнению другими патогенными вирусами и бактериями. Осложнения, вызванные такими патогенами, как *Mannheimia haemolitica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, часто приводят к развитию тяжелой бронхопневмонии, часто заканчивающейся летальным исходом [16, 28].

При развитии конъюнктивита наблюдаются сначала серозные, а затем слизисто-гнойные истечения из глаз, покраснение конъюнктивы, далее развиваются кератоконъюнктивиты, проявляющиеся помутнением и изъязвлением роговицы и зачастую приводящие к потере зрения у животного. При постановке диагноза ИРТ/ИПВ следует дифференцировать от острого конъюнктивита. При конъюнктивите, вызванном ГВ-1 КРС, на конъюнктиве и слизистой оболочке век наблюдаются язвочки и эрозии, а также белые очаги некроза. У инфицированных животных может быть помутнение роговицы, идущее от границы роговицы и склеры в центр глаза, в отличие от животных, инфицированных *Moraxella bovis*, когда помутнение идет из центра к краям роговицы.

Осеменение коров инфицированной спермой приводит к эндометри-

там, укорочению эстрального периода, снижению уровня оплодотворяемости, abortam и бесплодию [33].

При поражении репродуктивных органов у коров развивается инфекционный пустулезный вульвовагинит. У больных животных наблюдается лихорадка, депрессия, анорексия, животные стоят особняком от других, часто держа хвост в стороне во избежание контакта с вульвой. Мочеиспускание частое, болезненное. Слизистая вульвы и влагалища отекшая, покрасневшая, с небольшими слизистыми выделениями, покрыта множеством мелких пустул. Пустулы сливаются и формируют белый фибринозный слой, покрывающий изъязвленную слизистую. На дне влагалища наблюдается скопление слизисто-гнойных выделений без запаха. Острое течение длится 4–5 дней, при отсутствии осложнений полностью клинические признаки исчезают через 10–14 дней. Часто генитальная форма протекает субклинически и остается незамеченной [16].

Вирус передается при естественном осеменении, при обнюхивании и облизывании инфицированного животного. Если животные находятся в контакте друг с другом, в одном стаде могут быть животные с респираторной и генитальной формой болезни. ИПВ следует дифференцировать от некротического вульвовагинита неинфекционного происхождения ( травмы, химические ожоги). У быков при естественном осеменении коров с ИПВ может развиться инфекционный пустулезный баланопостит. Клиническая картина сходна с ИПВ.

ГВ-1 КРС выявляют в семени быков как с явными клиническими признаками баланопостита, так и латентно инфицированных. У переболевших животных сперма также часто контаминирована ГВ-1, что связано с периодическим выделением вируса. Вирус с инфицированной спермой передается при искусственном

осеменении. Также возможна механическая передача вируса между быками через инструмент на станциях по искусственному осеменению. Вирус хорошо сохраняется в замороженной сперме.

У телят, инфицированных в поздние сроки стельности *in utero* или в первые дни жизни, часто наблюдается генерализованная инфекция, в большинстве случаев заканчивающаяся летальным исходом. У больных телят наблюдается одышка, на слизистой рта, языка, пищевода и всех отделов желудка белые некротические очаги, диарея, а также диффузный перитонит.

У телят, инфицированных ГВ-5 КРС, наблюдаются энцефаломиелиты, болезнь проявляется нарушением координации движения, движением по кругу, облизыванием боков, угнетением и гибелью. ГВ-5 КРС генетически отличается от ГВ-1 КРС, но его невозможно отличить серологическими и иммунофлюоресцентными методами [10].

Инфицирование стельных восприимчивых коров ГВ-1 КРС вызывает аборт плода в любой период стельности, но чаще в последней трети стельности. ГВ-1 также может быть причиной маститов. У абортировавших коров может быть как клиническая форма ИРТ/ИПВ, так и латентная. Промежуток между заражением и абортом может длиться от 8 дней до нескольких месяцев, т.е. абORTы, вызванные ГВ-1 КРС, могут наблюдаться через несколько месяцев после вспышки инфекции в стаде. Телята, инфицированные в поздние сроки стельности, рождаются мертвыми или погибают в первые дни жизни с признаками септицемии.

После первичной репликации в слизистой оболочке верхних дыхательных путей, глаз, репродуктивных органов вирус переходит в латентное состояние в сенсорных ганглиях. Вирус может находиться в таком состоянии в течение всей жизни инфицированного животного, что

приводит к развитию персистентной инфекции при ИРТ/ИПВ, вследствие чего все инфицированные животные становятся персистентно инфицированными, у них наблюдается иммунный ответ, при этом животные могут оставаться клинически здоровыми. Вирус не размножается в период латенции, однако в результате стресса или на фоне лечения глюкокортикоидами может наблюдаться реактивация вируса. Следует отметить, что после длительного периода латенции уровень антител может значительно снизиться и животные будут серонегативными. Таким образом, отсутствие специфических антител при ИРТ/ИПВ не всегда свидетельствует об отсутствии вирусоносительства, и животные, персистентно инфицированные ГВ-1 КРС, периодически выделяют вирус во внешнюю среду с длительными периодами латенции [15, 29, 35].

**Патологоанатомические изменения.** Летальный исход при ИРТ/ИПВ наблюдается только в случае очень тяжелого течения, что наблюдается очень редко или при осложнении секундарной инфекцией. Первично ИРТ/ИПВ протекает бессимптомно, иногда на слизистых оболочках можно обнаружить белые некротические очаги, содержащие лейкоциты, фибрин и некротизированные клетки эпителия. При гистологическом исследовании можно обнаружить внутриклеточные тельца-включения.

При респираторной форме ИРТ/ИПВ такие изменения можно увидеть на слизистой оболочке носовой полости и носовых пазух, глотки, горлани и трахеи. Также наблюдаются петехиальные и экхимотические кровоизлияния, гнойно-слизистые выделения. Глоточные и легочные лимфоузлы увеличены. В бронхах наблюдаются некротические участки — геморрагическое воспаление слизистой и бронхиальный ангиогенез [28].

При обеих формах течения болезни патологические изменения заключаются

главным образом в образовании некротических очагов на слизистой оболочке, эпителиальные клетки вакуолизируются. Типичные герпесвирусные включения в клеточных ядрах находятся по периферии некротических фокусов. В некротизированных участках слизистой отмечаются интенсивные воспалительные изменения, часто отмечается скопление фибрина и клеточного дебриза [16].

Генитальная форма ИРТ/ИПВ не летальна.

У плодов и новорожденных телят при генерализованной форме отмечают наличие эрозий и язв на слизистой оболочке носа, пищевода и желудка, кроме того, некротические очаги нередки в печени, почках, селезенке и лимфоузлах. У абортированных плодов отмечают множественные некротические поражения во всех органах и тканях, особенно обширные — в печени.

При гибели плода *in utero* может наблюдаться аутолиз, ткани становятся рыхлыми, коричневатого цвета, в полостях тела присутствует жидкость, отсутствуют какие-либо характерные изменения. Однако при микроскопическом исследовании можно увидеть очаги некроза в печени, почках, надпочечниках и желудке.

При осложненной инфекции мультивирусной этиологии гистопатологические исследования показывают наличие у больных животных интерстициальной пневмонии, гнойной и гнойно-некротической бронхопневмонии. При хроническом течении, вызванном осложнением *Mycoplasma bovis*, наблюдаются признаки облитерирующего бронхиолита и перибронхиальной лимфоцитарной инфильтрации [28].

**Иммунитет.** Иммунитет при ИРТ/ИПВ включает в себя комплекс взаимодействий гуморальных и клеточных механизмов. Немаловажную роль на ранних стадиях инфицирования играет местный клеточный иммунитет.

Наличие вируснейтрализующих антител в сыворотке крови не является показателем резистентности животного или болезни. Оно говорит о более раннем инфицировании или вакцинации животного, а у телят до 6-месячного возраста — о наличии колоstralных антител.

Серопозитивные животные являются только частично защищенными от болезни. Для поддержания достаточного уровня антител в крови необходима периодическая стимуляция: внешняя (вакцинация) или внутренняя (реактивация латентного вируса). Такие иммунные животные могут быть инфицированными ГВ-1 КРС, но у них редко возникают клинические проявления и abortы.

Важную роль в защите новорожденных телят играет создание колоstralного иммунитета. Новорожденные телята имеют низкий уровень иммуноглобулинов, у них отсутствуют антитела в крови и тканях, поэтому выпаивание молозива имеет большое значение в создании защиты телят от инфекции в первые недели жизни. Колоstralный иммунитет, полученный при выпойке молозива в первые сутки жизни телят, длится от одного до нескольких месяцев, в зависимости от уровня антител в молозиве, от количества полученного молозива и от активности всасывания антител в кишечнике теленка.

В молозиве и молоке иммунизированных коров содержатся преимущественно иммуноглобулины подкласса IgG1, в отличие от многих других видов млекопитающих, у которых преобладает IgA. Поэтому если содержание IgG в молозиве недостаточно высокое, то у новорожденных телят увеличивается риск смертности в случае инфицирования в первые три месяца жизни. Для создания напряженного иммунитета телята должны получить молозиво, содержащее IgG в дозе 100–150 г на 1,5–2 л молозива, немедленно после рождения. Колоstral-

ный иммунитет считается напряженным при концентрации сывороточных IgG не менее 10 г/л на второй день после рождения [29, 34]. Концентрация иммуноглобулинов у телят достигает взрослого уровня примерно к 4–6 месяцам, и они представляют собой преимущественно иммуноглобулины класса IgG.

При изучении колоstralного иммунитета у телят, полученных от коров, иммунизированных внутримышечно или интраназально немаркированными вакцинами, было установлено, что выпаивание молозива от таких коров обеспечивает защиту телят от респираторной формы ИРТ и уменьшает тяжесть клинического течения болезни при инфицировании. Кроме того, такой пассивный иммунитет защищает животных от реинфицирования ГВ-1 и значительно снижает выделение вируса в окружающую среду.

Колоstralные антитела предотвращают системную локализацию вируса и, возможно, даже виремию. Также они значительно подавляют размножение вакцинного вируса в верхних дыхательных путях. Вирус-специфические колоstralные антитела против ГВ-1 преимущественно относятся к классу IgG1, появляются в носовом секрете телят сразу после выпойки молозива и выделяются слизистой респираторного тракта в течение 15–20 дней после рождения, в отличие от сывороточных антител, которые обнаруживаются до 4–6 месячного возраста. Вируснейтрализующие антитела также передаются телятам с молозивом от матерей, вакцинированных немаркированными вакцинами [21, 29].

Вместе с тем материнские антитела не защищают телят от инфицирования и латентного носительства при заражении вирулентным вирусом. Кроме того, на вирус часто не вырабатывается антигенный ответ, и такие телята становятся серонегативными и персистентно-инфицированными. Пассивный иммунитет

также не предотвращает выделение вируса и формирования латентной инфекции. Исследование телят, иммунизированных живой аттенуированной gE-маркированной вакциной, показало наличие у них иммунного ответа к gE, что свидетельствовало об инфицировании вирулентным штаммом ГВ-1 и реактивации вируса. Было экспериментально установлено, что вакцинация живой аттенуированной вакциной телят с колостральным иммунитетом может привести к формированию персистентно-инфицированных серонегативных животных. Так, температуро-чувствительная (ts) вакцина вызывала острую и латентную инфекции у иммунизированных телят как в присутствии, так и отсутствии материнских антител [29].

Внутримышечное или внутривенное введение дексаметазона вакцинированным живой аттенуированной вакциной ранее инфицированным телятам приводит к реактивации вируса и наблюдается выделение как полевого, так и вакцинного штаммов [29].

Персистентно-инфицированные телята могут оставаться серонегативными до 3–5-месячного возраста, затем в возрасте 6–9 месяцев у них могут появляться вирус-специфические антитела в результате реактивации латентного вируса [29].

**Диагностика.** Предварительный диагноз на ИРТ/ИПВ ставится на основании клинических, патологоанатомических и эпизоотологических данных. Клинические признаки ИРТ/ИПВ довольно патогномоничны, однако в большинстве случаев болезнь протекает субклинически, особенно у свободнопасущихся и иммунных животных. Для постановки окончательного диагноза необходимо подтверждение лабораторными методами, регламентированными стандартами ОIE, включающими в себя выявление ГВ-1 КРС или его компонентов, а также антител к нему (*табл. 1*). Из-за возможности развития латентной инфекции для подтверждения диагноза может быть достаточно обнаружения вирус-специфических антител у невакцинированных животных [16, 36].

Таблица 1. Методы диагностики ГВ-1 КРС (BoHV-1) согласно рекомендациям ОIE [36]

Метод	Цель исследования					
	Подтверждение отсутствия инфекции в популяции	Подтверждение отсутствия инфекции у животного перед транспортировкой	Оценка эффективности оздоровительных мероприятий	Подтверждение положительных случаев	Проведение эпизоотологического мониторинга инфекции	Оценка иммунного статуса животного или популяции после вакцинации
Идентификация возбудителя <sup>1</sup>						
Выделение вируса	–	++ <sup>2</sup>	+	++	–	–
ПЦР-РВ	–	++ <sup>2</sup>	+	+++	–	–
Выявление антител и характеристика иммунного ответа						
ИФА	+++	+++	+++	++	+++	+++
РН	++	++	++	+	++	++

*Примечание:*

+++ рекомендованный валидированный метод;

++ подходящий, но не валидированный метод;

+ метод может применяться в некоторых случаях, однако стоимость и другие факторы ограничивают применение;

н/п — метод не применяется.

Для диагностики используют носовые смывы, которые берут у 5–10 больных животных, когда серозные истечения еще не стали слизисто-гнойными. При генитальной форме ИРТ/ИПВ смывы берут со слизистой влагалища или препутия. Посмертно отбирают образцы слизистой оболочки респираторного тракта, легочные и бронхиальные лимфоузлы. В случае аборта исследуют печень, легкие, селезенку, почки плода и котиледоны плаценты. Выделение вируса из патологического материала проводят в культуре клеток почки, легких, тестикул КРС или любой другой чувствительной культуре. Идентификацию вируса проводят по наличию специфических цитопатических изменений в культуре клеток и подтверждают в реакции нейтрализации вируса (РН) с моноспецифической антисывороткой или моноклональными антителами.

Согласно рекомендациям ОIE (*табл. I*), основными методами диагностики ИРТ/ИПВ являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ чаще всего используется для лабораторного подтверждения заболевания, поскольку позволяет обнаружить вирусный геном на ранней стадии болезни, когда еще не сформировался иммунный ответ организма. Данная модификация ПЦР позволяет проводить количественную оценку динамики накопления целевого продукта с автоматической регистрацией результатов, а также снижает риск контаминации при постановке реакции.

Выделение вируса от одного больного животного не позволяет поставить окончательный диагноз на ИРТ/ИПВ, необходимо исследование группы животных с одновременным подтверждением серологическими методами. Наиболее широко для этого используют методы РН и ИФА. При положительном

результате должна наблюдаться сероконверсия от негативного к положительному результату или 4-кратный и более прирост титра вирусспецифических антител при исследовании парных проб сывороток крови, полученных с интервалом 3–4 недели. В ИФА исследуют не только сыворотку или плазму крови, а также молозиво и молоко.

К сожалению, ни один из существующих методов диагностики не позволяет выявить всех латентных носителей инфекции. Персистентно-инфицированных животных обычно выявляют при обнаружении вирус-специфических антител к ГВ-1 в пробах сыворотки крови, вырабатывающихся после реактивации вируса. В таком случае гуморальный иммунный ответ на латентный вирус ничем не отличается от такового при первичном инфицировании. В частности, возможно выявление вируснейтрализующих антител через 10–14 дней после реактивации вируса [11].

Для идентификации серонегативных вирусоносителей у живых животных используют метод применения дексаметазона, у павших — исследуют тройничный ганглий в ПЦР или ПЦР-РВ на наличие гена, кодирующего гликопротеин gB ГВ-1. Выявление серонегативных персистентно-инфицированных животных экономически очень важно как для стран, где проводятся программы по эрадикации ИРТ/ИПВ, так и для центров по искусственно осеменению, племенных хозяйств и свободных от ГВ-1 КРС стад и регионов.

Оценку колострального иммунитета проводят путем определения уровня IgG в сыворотке крови телят, полученной на второй день после рождения, методами ИФА и радиальной иммунодиффузии (РИД).

**Специфическая профилактика и меры борьбы.** В странах с высоким уровнем заболеваемости крупного рогатого скота

та ИРТ/ИПВ в качестве специфической профилактики и борьбы с заболеванием широко применяется вакцинация, проведение санитарно-гигиенических мероприятий и удаление из стада инфицированных животных. Вакцинация предотвращает появление клинических признаков, снижает уровень абортов, сокращает выделение вируса во внешнюю среду, однако не предохраняет от инфицирования. Во всем мире широко применяют живые и инактивированные моно- и ассоциированные вакцины против ИРТ/ИПВ.

Для ликвидации ИРТ/ИПВ в ряде стран Европейского союза разработаны национальные программы по искоренению болезни, основанные на применении маркованных вакцин, которые в сочетании с соответствующими диагностическими подходами позволяют дифференцировать инфицированных животных от вакцинированных (стратегия DIVA, Differentiation of Infected from Vaccinated Animals). Благодаря стратегии DIVA, во многих европейских странах ИРТ/ИПВ считается полностью ликвидированным.

При реализации программ по эradикации, основанных на стратегии DIVA, допускается применение только маркованных вакцин.

Разработаны живые и инактивированные маркованные рекомбинантные ДНК-вакцины с делецией генов, отвечающих за синтез ферментов, в частности тимидинкиназы, или гликопротеинов. Чаще всего таким маркером служит гликопротеин E (gE). Гликопротеин E формирует гетеродимер с гликопротеином I (gI), которые образуют Fc рецептор, участвующий в разрушении иммунного ответа у инфицированного животного, в том числе материнских антител. Комплекс gE-gI обеспечивает распространение образующихся вирионов в поляризованных клетках, спо-

собствуя транспортировке вируса по организму. Серонегативные животные и вакцинированные маркованной (gE-) вакциной вырабатывают специфические антитела к гликопротеину E в течение 10–14 дней после заражения вирулентным вирусом, что позволяет с помощью метода ИФА отличать вакцинированных животных от инфицированных [16, 18, 29]. Представителями таких вакцин являются Cattlemarker IBR Inactivated (Zoetis), Bovalto Ibraxion Inactivated IBR virus (Merial), содержащие инактивированные ГВ-1 с gE-делецией; Bayovac IBR Marker Vivum (Bayer), содержит gE-делецию в модифицированном живом аттенуированном ГВ-1.

Живые маркованные (gE-) вакцины приводят к развитию латентной инфекции у иммунизированных животных, реактивации и выделению вируса в результате иммуносупрессии. Также использование живых маркованных вакцин осложняется тем, что их нельзя применять стельным животным. По этой причине в последние несколько лет были разработаны и производятся новые маркованные вакцины с делецией сразу двух генов, кодирующих гликопротеин E и синтез фермента тимидинкиназы (tk), что уменьшает нейротропизм вируса, препятствуя латенции и реактивации вакцинного вируса. Применение таких вакцин внутримышечно и интраназально индуцирует гуморальный ответ у иммунизированных животных. Примером служит вакцина Hiprabovis IBR Marker Live (Hipra, Испания), имеющая двойную gE- и tk-делецию живого ГВ-1.

Кроме маркованных, на рынке широко представлены живые аттенуированные вакцины против ИРТ/ИПВ для интраназального и внутримышечного применения и инактивированные вакцины для внутримышечного

применения. Преимущество интраназальной вакцинации состоит в том, что она стимулирует синтез sIgA-антител и локальное образование интерферона в слизистых и сыворотке крови, что также оказывает противовирусное действие и способствует развитию иммунной системы новорожденного. Однако использование живых вакцин ведет к персистенции и экскреции аттенуированного штамма вируса, они не являются безопасными и могут вызывать побочные эффекты: внутриутробную инфекцию, иммуносупрессию, респираторную патологию. Если в процессе культивирования вируса используется сыворотка КРС, то ее возможные контаминанты (вирусы, микоплазмы и другие патогены) могут значительно увеличить риск использования живых вакцин против ИРТ/ИПВ.

Применение инактивированных вакцин против ИРТ/ИПВ обеспечивает защиту от внутриутробной инфекции плодов, исключает abortionы и появление латентных вирусоносителей. Однако использование различных адьювантов в составе инактивированных вакцин не только усиливает иммунный ответ, но и может привести к появлению нежелательных воспалительных реакций. Исследования показали, что вакцины с минерально-солевыми адьювантами менее реактогенны, чем с масляными адьювантами. Последние часто приводят к повышению температуры, формированию абсцессов в месте введения, но дают более длительный и напряженный иммунный ответ [8, 30].

Поскольку защита новорожденных телят обусловлена формированием колострального иммунитета, то для увеличения концентрации антител в молозиве ряд исследователей рекомендует вакцинацию глубокостельных коров. У животных с высоким титром сывороточных антител отмечается пропорцио-

нальный рост уровня антител в молочной железе. Кроме того, применение мультивалентных инактивированных вакцин у стельных коров индуцирует увеличение материнских антител в течение 5 недель после первой инъекции и в течение 3 недель после бустерной вакцинации. Действительно, применяя такую тактику вакцинации, к моменту отела в сыворотке крови коров выявляют относительно высокий уровень антител, что обеспечивает их высокое содержание в молозиве и передачу их новорожденным телятам.

Продолжительность колострального иммунитета зависит от ряда указанных выше факторов, однако все-таки в большинстве случаев не превышает 1–1,5 мес., что связано с катаболизмом антител и с синтезом собственных иммуноглобулинов в организме теленка. Вместе с тем вирус-специфические антитела могут быть выявлены и позднее. Так, при исследовании группы телят, получавших молозиво от матерей, иммунизированных живой вакциной (Titanium MLV Cattle Vaccines, Agri Laboratories, USA), колостральные антитела обнаруживали у телят в течение  $65,1 \pm 37,8$  дней [21]. В другом исследовании с применением живой вакцины (Titanium 5 L5 Cattle Vaccines, Agri Laboratories, USA) средняя продолжительность обнаружения колостральных антител в крови телят составила  $122 \pm 46,6$  дней [22]. При исследовании телят, получавших молозиво от коров, иммунизированных инактивированными вакцинами, в отдельных случаях было установлено наличие колостральных антител в сыворотке крови телят до 8 месяцев, однако в большинстве исследований уровень колостральных антител сохранялся в течение 45–53 дней [12].

Негативным эффектом материнских антител является их возможность блокировать выработку собственных

антител, в то время как в большинстве случаев у вакцинированных серонегативных телят наблюдается синтез антител на ГВ-1. Однако отмечены факты, что и при низком уровне материнских антител вакцинация телят как живыми, так и инактивированными вакцинами может не привести к формированию напряженного иммунного ответа на ГВ-1 [22]. Так, при иммунизации телят с материнскими антителами живой вакциной сероконверсия после первичной вакцинации отсутствовала, однако после повторного введения вакцины был выявлен вторичный иммунный ответ. Такое свойство, возможно, связано с вирус-специфическим Т-клеточным ответом. В целом наличие материнских антител блокирует продукцию собственных антител даже при вакцинации телят двойной дозой живой вакцины (Triangle 4), особенно у животных с высоким уровнем колостральных антител. Также подавление иммунного ответа колостральными антителами наблюдается при инфицировании телят вирулентным ГВ-1. Таким образом, как показывают исследования, лучшее время для вакцинации телят — это период между 16 и 28 днями жизни, что позволяет избежать интерференции с материнскими антителами. Живые аттенуированные вакцины лучше применять в 3–4-месячном возрасте [29]. Таким образом, схема вакцинации должна включать иммунизацию телят до 2-месячного возраста. При этом следует помнить, что слишком частая вакцинация телят приведет к антиген-специфической устойчивости, Т-клеточной супрессии и делеции Т- и В-лимфоцитов, что ведет к развитию аутоиммунного ответа. В частности, наблюдается перекрестная реактивность антител к вирусным белкам с поверхностными белками клеток иммунной системы [17].

В России для профилактики ИРТ/ИПВ разработаны и широко применяются инактивированная комбинированная вакцина «КОМБОВАК» против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней телят (ООО «Ветбioxим») и ее модификации («КОМБОВАК-Р», «КОМБОВАК-А»), живая вакцина ТК-А (ФГБНУ «ВИЭВ»), сухая ассоциированная вакцина «ТРИВАК» (ФГБНУ «ВИЭВ») для профилактики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота, вакцина ассоциированная против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и другие.

Хотя вакцинация не защищает животных полностью от инфицирования, она значительно сокращает количество случаев клинического проявления и степень тяжести течения болезни. Особенно важно вакцинировать племенных животных перед оплодотворением (осеменением) для предотвращения абортов, за исключением случаев экспорта в страны, свободные от ГВ-1. В странах, неблагополучных по ГВ-1, вакцинация перед проведением транспортировки и других стрессовых манипуляций позволит значительно снизить уровень заболеваемости ИРТ/ИПВ.

Меры борьбы с ИРТ/ИПВ предусматривают комплекс мер по недопущению заноса возбудителя болезни, диагностику, мониторинг и надзор, эффективные противоэпизоотические мероприятия. В нашей стране накоплен большой опыт борьбы с ИРТ/ИПВ, поскольку с момента идентификации возбудителя (1969 г.) было достаточно количество эпизоотических

вспышек болезни среди восприимчивых животных. 26 июля 1984 года Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР была утверждена «Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации заболевания крупного рогатого скота инфекционным ринотрахеитом-пустулезным вульвовагинитом», в которой прописана система мероприятий по ликвидации ИРТ/ИПВ в случае его возникновения. Данный нормативный документ является действующим и в настоящее время, хотя уже подготовлен проект Ветеринарных правил, включающих алгоритм проведения профилактических, диагностических и оздоровительных мероприятий при ИРТ/ИПВ.

## Литература

1. Верховская А.Е. Разработка и оценка эффективности вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К. Дис. ... к. вет. н. ВНИИ защиты животных. Владимир. 2008.
2. Глотов А.Г. Инфекционный ринотрахеит КРС: причины и методы борьбы. Аграрная наука. 2018; 11–12: 17–20.
3. Мищенко В.А., Костыркин Ю.А., Яременко Н.А., Лисицын В.В., Ручнов Ю.Е., Гетманский О.И. Вакцинация новорожденных телят против ИРТ и ПГ-3 КРС. Ветеринария. 2003; 7: 19–22.
4. Пчельников А. В. Этиология, возрастная и сезонная динамика вирусных респираторных болезней телят в племенных хозяйствах. Дис. ... канд. вет. наук. ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. М., 2017.
5. Сергеев В.А. Вирусные вакцины. Киев: Урожай. 1993.
6. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М. ВНИТИБП. 1998.
7. Юров К.П., Шуляк А.Ф., Петрова О.Г., Майджи О.В. Распространение инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в различных регионах России. Труды ВИЭВ. 2003; 73: 22–25.
8. Baccili C.C., Martin C.C., Decaris N., Madureira K.M., Chase C., Gomes. Effects of 3 Different Commercial Vaccines Formulations against BVDV and BHV-1 on the Inflammatory Response of Holstein Heifers. V. Vet. Sci. 2019; 6(3): 69.
9. Biswas S. et al. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) — a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. Vet. Q. 2013; 33(2): 68–81.
10. Cascio K.E., Belknap E.B., Schultheiss P.C., Ames A.D., Collins J.C. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. J. Vet. Diagn. Invest. 1999; 11: 134–139.
11. Castrucci G., Frigeri F., Salvatori D., Ferrari M., Lo Dico M., Rotola A., Sardoni ni Q., Petrini S., Cassai E. A study on latency in calves by five vaccines against bovine herpesvirus-1 infection. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2002; 25: 205–215.
12. Chammorro M.F., Walz P.H., Hains D.M., Passler T., Earleywine T., Palomares R.A., Riddel K.P., Galik P., Zhang Y., Givens M.D. Comparision of levels and duration of detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus 1, bovine viral diarrhea virus 2, bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1, and bovine parainfluenza virus 3 in calves fed maternal colostrum or colostrum-replacement product. Can. J. Vet. Res. 2014; 78: 81–88.
13. Cravens R.L., Ellsworth D.A., Sorenson C.D., White K.A. Efficacy of a temperature-sensitive modified-live bovine herpesvirus-1 vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1996; 208: 2031–2034.

14. Deptula W. Cell-mediated and humoral immunity in bulls infected with IBR/IPV virus (BHV1). *Arch. Vet. Pol.* 1994; 34: 13–23.
15. Deregt D., Loewen K.G. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 1995; 36: 371–378.
16. Fenner's Veterinary Virology by N. James MacLachlan, Edward J. Dubovi. 5th Ed. AcademicPress. 2020; 328–351.
17. Fitzpatrick D.R., Snider M., McDougall L., Beskorwayne T., Babiuk L.A., Zamb T.J., Bielefeldt Ohmann H. Molecular mimicry: A herpes virus glycoprotein antigenically related to a cell-surface glycoprotein expressed by macrophages, polymorphonuclear leucocytes, and platelets. *Immunology*. 1990; 70: 504–512.
18. Forsgren M., Klapper P.E. Herpes Simplex Virus Type 1 and type 2 // Zuckerman A.J., Banatvala J.E., Scoub B.D., Griffiths P.D., Mortimer P., editors. Principle & Practice of Clinical Virology. 6th ed. Wiley-Blackwell. West Sessex. UK. 2009; 96–131.
19. Fulton R.W. et al. Bovine herpesvirus-1: evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains. *Vaccine*. 2015; 33(4): 549–58.
20. Kahrs R.F. Viral diseases of cattle. 2nd ed. Ames. Iowa State University Press. 2001; 324.
21. Kirkpatrick J., Fulton R.W., Burge L.J., Dubois W.R., Payton M. Passively transferred immunity in newborn calves, rate of antibody decay, and effect on subsequent vaccination with modified live virus vaccine. *Bov. Pract.* 2001; 35: 47–55.
22. Kirkpatrick J.G., Step D.L., Payton M.E., Richards J.B., McTague L.F., Salihi J.T., Confer A.W., Cook B.J., Ingram S.H., Wright J.C. Effect of age at the time of vaccination on antibody titers and feedlot performance in beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2008; 233: 136–142.
23. Lemaire M., Meyer G., Baranowski E. et al. Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 4233–4238.
24. Leving R.L., Roth J.A. Immunity to bovine herpesvirus 1: I. Viral lifecycle and innate immunity. *Anim. Health Res. Rev.* 2013; 14: 88–102.
25. Maidana S.S. et al. Evidence of natural interspecific recombinant viruses between bovine alphaherpesviruses 1 and 5. *Virus Res.* 2017;242: 122–130.
26. McKercher D.G. Studies of the etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and blaschenausschlag (coital vesicular exanthema). *Am. J. Vet. Res.* 1963; 24: 501–509.
27. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. Infectious bovine rhinotracheitis (caused by bovine herpes virus-1). In *Veterinary Virology*, 3rd ed., edited by F.A. Murphy, E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek, M.J. Studdert. San Diego. Academic Press. 1999; 309–311.
28. Oliveira T.E.S., Pelaquim I.F., Flores E.F., Massi R.P., Valdiviezo M.J.J., Pretto-Giordano L.G., Alfieri A.A., Saut J.P.E., Headley S.A. *Mycoplasma bovis* and viral agents associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; doi: 10.1111/tbed.13223.
29. Petrini S., Iscaro C., Righi C. Antibody Responses to Bovine Alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) in Passively Immunized Calves. *Viruses*. 2019; 11(1): 2.
30. Pospisil Z., Krejci J., Machatkova M. The efficacy of an inactivated IBR vaccine in the prevention of intrauterine infection and its use in a disease-control programme. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1996; 43: 15–21.
31. Scott N. A., Whalley J.M., Mattick J.S. et al. Identification of major antigenic proteins of bovine herpesvirus 1 and their correlation with virus neutralizing activity. *Vet. Microbiol.* 1988; 16: 109–121.

32. Straub O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In *Infectious Diseases of Ruminants*. Eds. K. Dinter, B. Morein. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers. 1990; 71–108.
33. Van Engelenburg F.A.C., Van Schie F.W., Rijsewijk F.A.M. Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in Semen Is Detected Much Longer by PCR than by Virus Isolation. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 308–312.
34. Weaver D.M., Tyler J.W., VanMetre D.C., Hostetler D.E., Barrington G.M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J. Vet. Intern. Med.* 2000; 14: 569–577.
35. Winkler M.T.C., A. Doster, and C. Jones. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 5337–5346.
36. World Organization of Animal Health (OIE). *Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Manual of standards for diagnostic test and vaccines*. 2019; 1139–1157.

# **ВИРУСНАЯ ДИАРЕЯ – БОЛЕЗНЬ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (BOVINE VIRAL DIARRHOEA – MUCOSAL DISEASE, BVDV)**

*Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Иванов Е.В.*

Контагиозная болезнь, характеризующаяся многообразием клинических форм и синдромов, — широко распространенная в мире в популяции крупного рогатого скота и чаще протекающая в субклинической форме. Несмотря на то, что первоначально она была описана как патология желудочно-кишечного тракта, у восприимчивых животных вирус может вызывать рассасывание эмбрионов, abortionы на всех стадиях стельности, врожденные уродства плода, бесплодие, энтериты, респираторную патологию, болезнь слизистых оболочек и острые инфекции с иммуносупрессией. Вследствие иммуносупрессии вирус является одним из этиологических агентов массовых респираторных болезней телят («транспортная лихорадка» и «энзоотическая бронхопневмония») [36]. Инфекция описана также у овец, коз, свиней, бизонов, альпак, лам и белохвостых оленей [86].

Вирусная диарея — болезнь слизистых оболочек (ВД-БС) в настоящее время считается одной из самых важных инфекционных болезней крупного рогатого скота (КРС), имеющих экономическое значение для индустрии скотоводства. Природа вируса приводит к существенным экономическим потерям в производстве как молока, так и мяса в масштабе всего мира. Несмотря на то, что вирус вследствие своей убiquитарности может отрицательно воздействовать на все стадии производства животноводческой продукции, наиболее характерными и экономически значимыми последствиями вызываемой им инфекции являются репродуктивные

проблемы и болезни молодняка крупного рогатого скота. Трудно поддающиеся реальной оценке экономические последствия репродуктивных инфекций могут наносить колоссальный ущерб вследствие негативного воздействия на индивидуальное животное и на чистый доход в пересчете на одну корову, а также и на стадо в целом [36, 86, 82]. Подсчитанные потери составляют 88–200–687 USD/животное в зависимости от региональных особенностей и системы ведения животноводства. В среднем прямые экономические потери среди серонегативных коров в молочных стадах выше, чем в мясных (199–50 USD против 174–60 USD) [82, 89].

Возбудитель хорошо адаптировался к репродуктивной системе, что способствует его постоянному сохранению в популяции КРС. Однако это носительство не проходит без вреда для животных, поскольку вирус вызывает иммунотолерантные эмбриональные инфекции, что приводит к рождению персистентно инфицированных (ПИ) телят. Следствием прямого инфицирования плода являются многочисленные нарушения репродуктивной системы коров и телок. В свою очередь, ПИ животные действуют как постоянный источник возбудителя инфекции для восприимчивых животных в пределах популяций КРС, что способствует стационарному проявлению болезни [36, 80, 81, 89].

Особую актуальность болезнь приобретает при интенсификации молочного и мясного скотоводства и международной торговле животными. В 2007 г. МЭБ внесло ВД-БС КРС в список бо-

лезней, подлежащих регистрации (OIE.com, 2019).

**Историческая справка.** Болезнь, получившая название «вирусная диарея», впервые была описана в 1946 г. Olafson P. и соавт., которые характеризовали ее как остро протекающую болезнь КРС с высокой заболеваемостью и смертельным исходом, сопровождавшуюся диареей, выраженной лейкопенией, высокой лихорадкой,abortами [79]. В 1953 г. Ramsey и Chivers сообщили о «болезни слизистых оболочек» также в США, сопровождавшейся низкой заболеваемостью, но высокой летальностью [84]. Долгое время эти болезни считались разными, и только в 1984 г. удалось воспроизвести классическую болезнь слизистых оболочек экспериментально [39], после чего эти синдромы были сгруппированы в одну болезнь.

ВД-БС КРС не привлекала к себе достойного внимания до 1993 г., когда в Северной Америке произошла вспышка геморрагической болезни, вызванная нецитопатогенным штаммом вириуса 2 вида (BVDV-2), сопровождавшаяся высокой заболеваемостью и летальностью животных. Эта и последующие вспышки характеризовались респираторными заболеваниями, диареей, abortами, выраженной тромбоцитопенией с мультисистемными кровоизлияниями, схожими с признаками болезни слизистых оболочек, и внезапной гибелью телят и взрослых животных [40]. Открытие и дальнейшее выделение изолятов BVDV-2 от крупного рогатого скота с тяжелыми заболеваниями и геморрагическим синдромом в разных регионах страны укрепило уверенность научного сообщества в том, что вириус имеет широкий антигенный спектр и изоляты этого вида могут быть вирулентнее изолятов BVDV-1.

Этот факт во многом изменил отношение к болезни, а также подходы к ее изучению. Реклассификация агента

из семейства *Togaviridae* во *Flaviviridae*, а также установление родственных связей с вириусами классической чумы свиней и пограничной болезни овец во многом способствовали прогрессу в изучении возбудителя и патологии, которую он вызывает. Из-за тесного родства с вириусом гепатита С человека вириус ВД-БС официально признан суррогатной моделью этой болезни и используется для изучения противовириусной активности различных препаратов.

В нашей стране изучение болезни началось в 60-х годах прошлого столетия. Так, Бучнев К.Н. в 1967 г. описал «вириусное заболевание КРС с поражением слизистых оболочек» в Казахстане [1], Макаревич В.Г. и соавторы определили спектр чувствительных культур клеток к вириусу [24].

В СССР первая вспышка болезни в форме геморрагического воспаления желудочно-кишечного тракта зарегистрирована сотрудниками ВИЭВ в 1970–73 гг., однако в то время провести полную идентификацию выделенного этиологического агента было невозможно. В последующие годы ими были разработаны методы диагностики и средства специфической профилактики болезни [19, 23].

**Возбудитель.** Согласно современной классификации, возбудителями болезни являются 3 различающиеся антигенно и генетически вида вириуса, относящиеся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*: *Pestivirus A*, *B* и *H*, ранее называвшиеся BVDV-1, BVDV-2 и BVDV-3 [92]. Все вириусы вызывают сходную патологию у восприимчивых животных и являются причиной экономически значимых болезней КРС во всем мире, в том числе и в России [3, 7, 9, 12, 25, 28, 42, 46, 59, 69, 72, 82].

Кроме этого, они являются контаминантами биологических препаратов (эмбриональная сыворотка, перевива-

емые линии культур клеток, вакцины для медицины и ветеринарии, интерфероны, трипсин, биотехнологические препараты, эмбрионы, стволовые клетки, сперма быков-производителей и др.) [21, 27, 34, 51, 53, 54, 70, 95].

Вирионы вирусов представляют собой сферические частицы диаметром 40–60 нм и состоят из центрального нуклеокапсида, включающего кодируемый вирусом протеин С и геномную РНК, окруженного липидным бислоем. Капсид выглядит в виде электронно-плотной сердцевины диаметром около 30 нм, структура и симметрия которой не определены. Кодируемые вирусом протеины ( $E^{ns}$ , E1 и E2) связаны с липидным бислоем. Вирион окружен полиморфной оболочкой в виде кольцеобразных субъединиц размером 10–12 нм на поверхности вириона. Молекулярная масса вириона составляет приблизительно  $6.0 \times 10^7$  КД.

Вирионы стабильны при значениях pH 5,7–9,3. Инфекционность вируса не меняется при замораживании, но снижается при температуре 40°C. Вирус инактивируется органическими растворителями и детергентами, трипсином, этиленимином, гамма-излучением. Во внешней среде вирус выживает не более 2 недель. Прогревание при температуре 56°C в течение 15 минут снижает его активность в 10 раз, полностью инактивируется вирус в течение 1 часа.

Пестивирусы содержат два протеина, являющиеся уникальными для этого рода:  $N^{pro}$  и  $E^{ns}$ . Первый является неструктурным белком, кодирующим открытую рамку считывания, и представляет собой протеазу, функцией которой является саморасщепление из полипептида вируса. Второй уникальный продукт генов вируса —  $E^{ns}$  представляет собой оболочечный гликопротеин, обладающий выраженной РНК-азной активностью.

**Геном вируса** представлен одногнитевой положительно заряженной РНК, длиной 12,3 тыс. нуклеотидов и имеет одну открытую рамку считывания длиной около 4000 кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных белков, фланкированную с 5' и 3' концов нетранслируемыми областями (5' UTR и 3' UTR). 5'UTR является наиболее консервативным регионом, содержит вторичную структуру и действует как внутренний рибосомальный сайт внедрения и регуляции перевода открытой рамки считывания в активное состояние при внедрении ее в клетку организма животного [36, 92] и чаще всего используется для филогенетического анализа.

**Внедрение вируса в клетки, трансляция и репликация.** Процесс прикрепления и внедрения вируса в чувствительные клетки полностью не изучен. Основываясь на поведении других flavи- или пестивирусов, было предположено, что эти процессы являются многоступенчатыми и инициируются рецептор-опосредованным эндоцитозом, в который вовлекается взаимодействие белков вируса  $E^{ns}$  и E2 с поверхностными молекулами клеточной стенки. Геномная РНК высвобождается после эндоцитоза и служит мРНК. Субгеномные молекулы мРНК не выявляются. Начало трансляции определяется механизмом, для которого требуется внутренний рибосомальный сайт внедрения, находящийся внутри региона 5' UTR [36, 92].

**Протеины вируса.** Открытая рамка считывания вируса транслируется в полипротеин с вирусными белками, расположенными в следующем порядке:  $N^{pro}$ , C,  $E^{ns}$ , E1, E2, p7, NS2-3 (NS2 и NS3), NS4A, NS4B, NS5A и NS5B. На полипротеин воздействуют контртрансляционно и посттрансляционно протеазы клетки-хозяина и вируса [36].

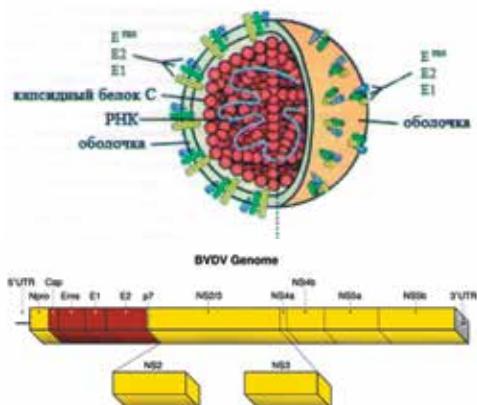


Рис. 1. Строение вириуса вириусной диареи крупного рогатого скота [36]

$N^{pro}$ , NS3 и NS4B могут играть роль в уклонении вируса от иммунной системы организма животного и цитопатогенности.  $N^{pro}$  является терминальной аутопротеазой, подавляющей выработку интерферона типа 1 в культурах клеток. Инактивация или делеция его приводит к восстановлению интерферонового ответа в культурах клеток.

*Структурные протеины вируса.* Белками зрелого вириона являются С, Е<sup>ms</sup>, Е1 и Е2. Белок С представляет протеин нуклеокапсида, является основным и относительно консервативным среди пестивирусов. Его терминальная часть содержит внутреннюю сигнальную последовательность, направляющую трансляцию структурных гликопротеинов в эндоплазматический ретикулум. Протеин Е<sup>ms</sup> гликозилирован и формирует дисульфидсвязанные гомодимеры. В клеточных системах его обнаруживают в виде связанной с вирусом формы или в свободном состоянии в культуральной жидкости. Он проявляет необычную рибонуклеазную активность, функция которой в жизненном цикле вируса неизвестна. Антигены, ингибирующие рибонуклеазную активность,

нейтрализуют инфекционность вируса КЧС. Рибонуклеазная активность не требует образования димера или гликозилирования.

В настоящее время неизвестно, содержит ли  $E^{ms}$  в своем составе нейтрализующие эпитопы (подобно вирусу КЧС), однако иммунитет, обусловленный инактивированными вакцинами, не зависит от наличия специфических антител к этому протеину.

Протеины E1 и E2 обладают потенциальными мембрано-распределяющими доменами и гликозилированы. Протеин E2 является иммунодоминантным структурным протеином и содержит нейтрализующие эпитопы. Регион, кодирующий нейтрализирующие эпитопы для этого белка, находится в составе гипервариабельного региона, расположенного в N-терминальной области протеина E2. Антигенная вариабельность этого белка обуславливает слабую эффективность вакцин.

**Неструктурные протеины вируса.** Первым вирусным протеином, кодируемым открытой рамкой считываания, является уникальный неструктурный протеин N<sup>pro</sup>, функционирующий как аутопротеиназа, саморасщепляющая себя из полипротеина. Другой неструктурный белок p7 расположен вслед за белком E2 также в составе полипротеина. Он состоит из центральнонегаряженного региона, фланкированного гидрофобными окончаниями. Предполагается, что он необходим для образования инфекционного вируса, но не для репликации РНК. Он происходит из белка E2, что приводит к образованию двух внутриклеточных форм E2 с различными C-концевыми участками (E2 и E2-p7). Ни p7, ни E2-p7 не связаны с инфекционностью вируса [36].

Следующий неструктурный белок в

составе полипротеина — серин-протеаза NS2/3 является маркером цитопатогенности вируса. У цитопатогенных штаммов вируса он расщепляется на две составные части — NS2 и NS3. Функция NS2 неизвестна. Он не требуется для репликации РНК и его выщепление из NS2-3 не влияет на серин-протеазную активность [44].

Вирус существует в виде двух биотипов (БТ): цитопатогенного (ЦП) и нецитопатогенного (НЦП). Последний, в отличие от цитопатогенного БТ, не вызывает видимую деструкцию культур клеток. Это не означает, что нецитопатогенный БТ не обладает патогенностью и вызывает только субклинические инфекции, как считалось ранее. Принадлежность к биотипу не коррелирует со способностью вируса вызывать болезнь. Существует мнение, что штаммы вируса всегда патогенны для КРС, но вирулентность их различна. В природе преобладает нецитопатогенный БТ (90% изолятов), имеющий наибольшее эпизоотологическое значение, чем ЦП, поскольку только он способен вызывать трансплацентарную инфекцию, приводящую к репродуктивным нарушениям у коров и персистентной инфекции плода, а также иммуносупрессию при острых постнатальных формах инфекции [36, 44, 64, 92].

ЦП штаммы вируса, несмотря на их способность преодолевать плацентарный барьер, инфицировать плод и вызывать аборты, не могут устанавливать персистентные инфекции и поэтому не имеют механизма поддержания своей персистенции в стаде. Кроме того, НЦП штаммы чаще вызывают аборты.

Вирус подвержен мутациям, вызванным ошибками РНК-зависимой РНК-полимеразы, и рекомбинациям, приводящим к образованию различа-

ющихся, но близкородственных его мутантов (субтипов). В связи с этим патогенность возбудителя варьирует и имеет «штаммовую» зависимость [66, 67].

Число известных к настоящему времени субтипов BVDV-1 составляет 21, BVDV-2 — 5 и BVDV-3 — 4 [99], их роль в патологии КРС до конца не ясна. Все виды вируса включают ЦП и НЦП биотипы [36, 44].

Первый вид вируса распространяется повсеместно. Штаммы второго вида циркулируют преимущественно в США и Канаде, а в Европе, Азии и Южной Америке регистрируют лишь спорадические случаи вызванной ими инфекции. Третий вид вируса впервые выделен в 2004 г. в Германии из эмбриональной сыворотки КРС, изготовленной в Бразилии [95], а позднее обнаружен у КРС в Южной Америке [32], Азии [59] и Европе [43, 100].

В России инфекция вирусом 2 вида (BVDV2a) установлена в 2008 году, BVDV-3 — в 2015-м [4, 21, 22, 29]. В последующие годы среди импортированного и местного скота в Сибири и Республике Казахстан были выявлены девять субтипов BVDV-1: 1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1g, 1i, 1k, 1p и три субтипа BVDV-2: 2a (20%), 2b (10%) и 2c (5%). Преобладающим субтипом являлся BVDV1b [12, 15, 17, 22]. На территории Центральной части России в популяции домашнего скота и лесных бизонов выявлены два антигенно отличающихся штамма вируса 1a и 1m [30]. BVDV-3 чаще выявляли в лотах эмбриональной сыворотки, используемой в медицинских и ветеринарных НИИ при производстве диагностических препаратов и вакцин [21, 22].

На рис. 2 представлена филогенетическая дендрограмма, отражающая генетический полиморфизм вируса в регионе Сибири.

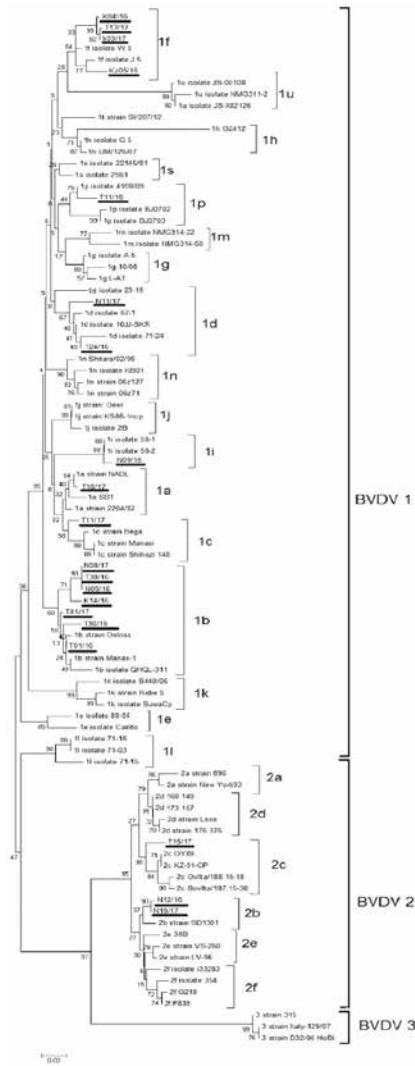


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка 5' нетранслируемой области (5'UTR) генома двух видов вируса вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота (BVDV-1 и BVDV-2), циркулирующих в хозяйствах Сибири и Казахстана.

Выравнивание последовательностей провели с использованием ClustalW метода. В качестве внешней группы использовали последовательности вириуса вириусной диареи третьего вида (BVDV-3). Бутстреп поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Исследованные изоляты подчеркнуты. Для референтных штаммов указано название и номер в базе данных GenBank [22]

Все виды вируса вызывают болезнь, но сверхострую форму инфекции ВД-БС КРС, сопровождающуюся тяжелыми клиническими признаками — только НЦП вирус второго вида [40, 57, 64, 66].

Некоторые авторы приводят доказательства связи между видом вируса и клиническими симптомами, которые он вызывает. От телят с респираторными и желудочно-кишечными болезнями чаще выделяются НЦП изолятами BVDV-1b, а от животных с наличием патологии воспроизводства — BVDV-2a. Изоляты второго вида вируса выделяются от животных с признаками сильной тромбоцитопении и геморрагического синдрома, однако не все из них способны вызывать данную патологию. Высказывается предположение, что в природе существуют низковирулентные и авирулентные изоляты второго вида, преобладающие над вирулентными [4, 36, 40, 57].

Особенностью вируса является фенотипическое разнообразие антигенных изменчивости, инфекционности, скорости репликации, что может быть связано с геномными реорганизациями, мутациями или рекомбинациями. Биотип, генотип и перекрестные антигенные реакции взаимодействуют независимо друг от друга, что непосредственно влияет на патогенность вируса, т.к. она имеет штаммовую зависимость. Известно, что ЦП штаммы возникают из НЦП штаммов путем их мутации. Считается, что мутация — это предполагаемая стратегия, которую использует вирус для уклонения от иммунного ответа хозяина и сохранения в популяции КРС [33, 36, 57].

Для видовой дифференциации вирусов самым надежным критерием является определение нуклеотидной последовательности геномной РНК. Чаще исследуют 5'-нетранслируемый регион (5'-UTR), являющийся высоко консер-

вативной областью, подходящей для амплификации. Для филогенетического анализа дополнительно анализируют участок гена E2 (наиболее вариабельный) и участки генов E<sup>ns</sup> и N<sup>pro</sup> и NS3 [33, 36].

**Эпизоотология.** Болезнь регистрируется во всех странах мира и носит энзоотический характер. Инфицированность КРС составляет 60–85% в зависимости от региональных особенностей [3, 19, 28, 34, 36]. В стадах с наличием ПИ животных она может достигать 90–100% [36, 86]. При заносе вируса (или вируса другого вида) в неиммунное стадо могут возникать значительные экономические потери, выражющиеся в abortах, болезнях молодняка, снижении динамики роста и кондиции животных, приводящих к ограничению торговли скотом.

#### **Источники и пути передачи возбудителя.**

Для своего выживания в популяции КРС вирус использует комбинированную стратегию, основанную на двух принципах: «инфицируй и исчезай» (эстафетная передача) и «инфицируй и персистирай». В первом случае это приводит к возникновению у восприимчивых животных проходящих «транзитных» острых форм инфекции (ТИ) и дальнейшей передаче другим, а во втором — к пожизненной персистентной инфекции (ПИ) у отдельных особей путем уклонения от их иммунной системы при помощи уникальных механизмов, не имеющих аналогов у других вирусов [81]. Поэтому ТИ животные являются кратковременными и тупиковыми источниками вируса, а ПИ представляют собой постоянный эндогенный источник возбудителя в стаде и играют основную роль в поддержании стационарного неблагополучия хозяйств [74, 80, 86].

Вирус передается горизонтально воздушно-капельным или фекально-оральным способом путем ингаляции аэрозоля или заглатывания материала,

контаминированного секретами организма (слюна, выделения из глаз и носа, моча, фекалии, выделения из матки, амниотическая жидкость) от инфицированных животных или вертикально от матери потомству. Наибольшую опасность для маточного поголовья во время репродуктивного цикла представляют ПИ телята при совместном содержании.

Поддержание инфекции и передача возбудителя внутри стад КРС и между ними происходит только при наличии ПИ животных. Как правило, в стадах, в которых присутствуют такие животные, происходит постоянная циркуляция эпизоотических штаммов вируса и регистрируется повышенный уровень патологии воспроизводства и болезней молодняка. Высокие титры вируснейтрализующих антител у матерей на поздних стадиях стельности служат индикатором наличия у них ПИ плодов [9, 36, 47, 76].

Перsistентная инфекция развивается при заражении плода только НЦП биотипом вируса в период с 18-го по 125-й дни внутриутробного развития, когда его иммунная система еще не сформирована [36, 74]. Это приводит к рождению иммунотолерантных телят, являющихся постоянным источником возбудителя для неиммунных животных, особенно коров и телок во время репродуктивного цикла. Концентрация вируса в крови таких особей высокая, и они выделяют его в течение всей жизни со всеми секретами и экскретами, включая сперму. Выработки специфических антител у ПИ животных не происходит или происходит на низком уровне [36].

ПИ телята часто рождаются слабыми, с нарушением координации движений, являются восприимчивыми к заражению другими инфекционными агентами и часто погибают до 6 мес. Однако некоторые выглядят физиологически развитыми, достигают репродуктив-

ного возраста и способны передавать вирус потомству [36]. Превалентность таких животных в общей популяции КРС при стационарном течении болезни в среднем составляет 1–3,3% и зависит от размера стада, плотности размещения скота на единицу площади, частоты ввода новых животных, уровня их молочной продуктивности, внутрихозяйственного движения поголовья [26, 36, 86]. Их количество повышается при синхронизации охоты у коров и в период массовых отелов, а в некоторых случаях при комплектовании молочных комплексов из многих источников может достигать 10% [10].

Острая или «транзитная» инфекция развивается у иммунокомпетентных животных в любом возрасте при заражении вирусом обоих биотипов, но чаще НЦП штаммами. Она характеризуется высокой заболеваемостью и низкой смертностью [36, 86], кратковременной (10–12 дней) виреемией. Выделение вируса происходит только в указанный период и прекращается с началом выработки антител, после чего он элиминируется из организма. Сероконверсию выявляют у животных через 3–12 недель после заражения. У переболевших животных развивается пожизненный иммунитет к инфицировавшему виду/субтипу вируса, и они уже не являются источником возбудителя инфекции.

В отличие от единичных источников возбудителя, которые представляют собой ПИ-вирусоносители, при острых формах их число может быть значительным [36]. При этих формах инфекции имеет место «эстафетная» передача возбудителя с вовлечением в процесс большого количества неиммунных особей, которые сами начинают выполнять функцию временного (транзитного) источника возбудителя инфекции. Поэтому при завозе животных в качестве потенциальных источников вируса сле-

дует рассматривать не только ПИ-носи-телей, но и животных, больных острыми формами болезни с субклиническим течением.

Последствия ввода ПИ животного в стадо мясного направления с сезонными случками и отелами зависят от времени их ввода относительно сезона случки и последующего иммунного статуса телок и коров во время периода ранней стельности. Первоначально его ввод может сопровождаться пиком болезни и следующими за ним хроническими репродуктивными проблемами на низком уровне в течение последующих месяцев и лет. Если ПИ животное вводится в стадо перед началом случного периода, то, как правило, в этот момент значительная часть животных этого стада не имеет иммунитета к вирусу, необходимого для предотвращения инфицирования, и, как следствие этого, возникают неудачные оплодотворения, аборты или фетальная инфекция. Если же ПИ животное находится в контакте со стадом в период случной кампании длительное время, то большая часть его будет инфицирована и будет реагировать сероконверсией к инфицирующему вирусу [36, 78].

Способ ведения животноводства в стадах молочного направления отличается от такового в мясных стадах. Отъем молочных телят от коров происходит в короткие сроки после рождения, и они не находятся в контакте с животными основного стада во время периода их стельности. Поэтому передача вируса от инфицированных телят стельным коровам и нетелям в данном случае резко снижается по сравнению с мясными, где телята постоянно присутствуют в общем стаде. Однако в молочных стадах происходит постоянный ввод ремонтных телок в основное стадо, которые либо закуплены из других хозяйств и ферм, либо поступают по

импорту. В связи с этим значительно возрастает риск ввода ПИ ремонтных телок или не ПИ стельных животных, вынашивающих ПИ плоды. Поэтому возможность постоянного инфицирования в молочных стадах значительно выше, чем в мясных [9, 36, 58, 78, 86].

Неконтролируемая диссеминация патогенного вируса во внешней среде приводит к постоянному вовлечению в эпизоотический процесс новых животных, не имеющих антител к вирусу. В данном случае нет разрыва эпизоотической цепи и эпизоотический процесс практически непрерывен, что приводит к постоянным репродуктивным проблемам, увеличению числа ранней эмбриональной смертности, абортов, врожденных уродств, рождению ПИ телят, а также болезням телят в постнатальный период, которые носят стационарный характер.

Большое значение болезнь приобретает в настоящее время при массовом завозе высокопродуктивных племенных животных в Россию, статус которых в отношении вирусной диареи часто неизвестен, так же как и наличие вакцинации перед отправкой. Массовые репродуктивные проблемы у завезенных животных возникают в течение относительно короткого периода времени (в пределах 6 мес.) при формировании молочных комплексов. Они часто обусловлены наличием ПИ нетелей, инфицирующих других животных в группе во время транспортировки и по прибытию в страну-импортер. Такие нетели подвержены риску рождения ПИ потомства, служащего в дальнейшем в качестве постоянного эндогенного источника вируса в стаде для телят и маточного поголовья. В данном случае период формирования относительного благополучия («стационарности») стада может затягиваться до двух–трех лет в зависимости от условий содержания животных, их размещения,

длительности комплектования помещений, количества поступающих животных и эпизоотической ситуации в странах-импортерах [10].

В некоторых случаях проблему представляют серонегативные нетели, завезенные из некоторых стран Европы, в которых ВД-БС КРС ликвидирована и вакцинация не применяется. Возможны два варианта. Согласно первому, такие нетели инфицируются во время транспортировки в смешанных гуртах, либо на временных выпасах и при поступлении в хозяйство реагируют сероконверсией к вирусу с последующими abortами, рождением ПИ телят и другой патологией. По второму — серонегативные нетели рождают серонегативных телят, не получивших колостральных антител к вирусу. Такие телята заболевают первыми при контакте с телятами, рожденными от местных коров.

По мере увеличения пропорции животных с иммунитетом к вирусу снижается доля восприимчивых к заражению особей и инцидентность болезни. В связи с этим со временем меняется и ее проявление: от репродуктивных проблем к болезням телят. Однако наличие постоянного эндогенного источника возбудителя обеспечивает непрерывность эпизоотического процесса, при котором происходит формирование стационарно неблагополучных очагов по ВД-БС КРС с инцидентностью репродуктивной патологии на низком уровне [11, 36, 86].

При заносе вируса в стадо с низким уровнем популяционного иммунитета аборты могут достигать 14–25% в течение 6-месячного периода, ранняя эмбриональная смертность — 44,4–78,6%, а молочная продуктивность коров снизится на 10% [46, 55]. В стадах с энзоотическим течением болезни и высоким уровнем серопозитивности животных эти показатели могут составлять 7–10%

с колебаниями, связанными с особенностями ведения животноводства в хозяйстве [36, 46, 55]. Инфекционный статус конкретного стада может меняться в течение 2–3 лет от активной циркуляции вируса до иммунного состояния и до повторного формирования восприимчивого статуса [58].

Динамика проявления репродуктивной патологии животных на уровне стада носит циклический характер. Инфекция может расцениваться как «латентная» в пределах  $6 \pm 9$  мес. до рождения первого теленка или короче, если происходят abortionы. После этого начинается период распространения вируса в стаде, а продолжительность и степень трансмиссии зависят от количества рожденных ПИ телят, времени их выживания в стаде, в какой группе животных они размещены, т.е. от хозяйственных факторов. Если происходит дополнительное инфицирование неиммунных животных на ранней стадии стельности, а ПИ животные погибают или проданы, то наступает второй период латентного состояния. После рождения нового поколения ПИ телят цикл повторяется снова.

Таким образом, инфекция может рассматриваться как способная к прерывистому течению с периодами латенции (скрытого течения), во время которых ПИ животные находятся во внутриутробном состоянии. Обычно увеличение количества ПИ животных происходит в пределах каждого цикла, которые заставляют инфекцию проявляться по типу 2 или 3 стадий [58].

В зависимости от начального иммунного статуса стада увеличение инцидентности репродуктивных проблем может быть незамеченным до наступления третьей стадии или позже. Это происходит обычно через 2–3 года после первичного инфицирования стада. Во многих случаях установить точное

время заноса вируса в стадо невозможно. По мнению Houe H. [58], специфический период риска возникновения ВД-БС КРС в молочных стадах с наличием ПИ животных определяется сроками достижения возраста 6 мес. самым старшим ПИ теленком.

Быки-производители играют незначительную роль в качестве источника возбудителя инфекции [6, 52, 55], а их сперма может иметь значение, когда она получена от:

- серонегативных ПИ быков, выделяющих вирус в течение всей жизни;
- ТИ быков, выделяющих вирус в течение 2–3 недель до выработки специфических антител;
- серопозитивных быков с тестулярной инфекцией, выделяющих вирус до 2,75 года после заражения.

Рождение ПИ телят после использования инфицированной вирусом спермы возможно, но происходит относительно редко.

**Влияние вируса на воспроизводительные функции коров и телок.** Вирус может вызывать эмбриональную смертность на всех стадиях стельности и бесплодие, возникающие вследствие дисфункции яичников [47], воспаления матки [55] и прямого воздействия на эмбрион [55, 75]. Аборты при данной болезни группируются в несколько категорий: 18–45 дней (до имплантации), 40–125, 125–175 и 175 — дней до отела [36, 86].

**Ранняя стадия стельности (18–45 дней).** Следствием размножения вируса в яичниках на ранних стадиях стельности является бесплодие. После субклинической инфекции стельный скот обычно реагирует сероконверсией к вирусу, а коэффициент плодотворного осеменения может составлять 78,6%; 44,4% и 22,2% при инфицировании до, после и во время осеменения соответственно [55]. Коэффициент плодотворного осеменения

ниже у телок, реагировавших сероконверсией к вирусу при осеменении или после него, чем до осеменения. После имплантации может возникать трансплацентарная инфекция, исход которой зависит от возраста плода, его иммунокомпетентности, биотипа и вирулентности вируса. Предвестником ранней эмбриональной смертности у телок служат высокие титры вируснейтрализующих антител перед первым осеменением, сероконверсия к вирусу во время оплодотворения и в первые 45 дней стельности, что говорит о прошедшей транзитной инфекции и является прогностическим признаком снижения уровня воспроизведения [55]. Происходит рассасывание эмбрионов, и животные могут повторно приходить в охоту.

**Средняя стадия стельности.** У плодов, выживших после инфекции НЦП биотипом вируса в период между 18 и 125 днями стельности, неизбежно развивается состояние иммунологической толерантности к инфицирующему вирусу, и они после рождения становятся ПИ. Точный механизм развития иммунотолерантности неизвестен, но необходимым для нее условием является циркуляция вируса в стаде в период формирования иммунной системы плода, которая происходит до 4 мес. стельности [55]. Протеины вируса воспринимаются как аутоантигены, что сопровождается отрицательной селекцией вирусоспецифических В и Т-лимфоцитов в период их онтогенеза. Возможно, она возникает из-за специфической толерантности В- и Т-лимфоцитов к вирусу или блокады синтеза интерферона первого типа тканями плода, что приводит к отсутствию выработки антител к вирусу [55, 78].

**Стадия стельности 100–150 дней.** Инфицирование плода в этот период может привести к возникновению врожденных уродств. На этой стадии завершается органогенез плода, и его иммунная

система становится полностью функциональной. Причинами поражения эмбриона является сочетание прямого повреждения вирусом клеток плода и ответная воспалительная реакция организма матери. Могут возникать поражения центральной нервной системы: микроэнцефалопатия, гидроцефалия, гидроэнцефалия, порэнцефалия, гипоплазия мозжечка и гипомиелинизация. К другим тератогенным эффектам вируса относятся: врожденная катаракта, микрофтальмия, неврит глазного нерва, дегенерация сетчатки, гипоплазия тимуса, гипотрихоз, аллопеции, вьющаяся шерсть, «болезнь гиены», слабый остеогенез, брахигнатизм нижней челюсти и задержка роста. Данная патология встречается сравнительно редко и свидетельствует об активной циркуляции вируса в стаде и наличии в нем ПИ животных [36, 55, 78, 86].

**Поздние стадии стельности.** На более поздних стадиях стельности плод становится иммунокомпетентным, и организогенез обычно полностью завершен, однако аборты могут возникать и в это время. Может развиваться мумификация плода с его задержкой в матке до 6 мес. или ранним изгнанием. По данным некоторых американских лабораторий, вирус выявляли в 0,1%; 1,5%; 4,54% и 27,2% проб от числа поступивших в лабораторию [14, 18]. Гибель плода обычно наступает через 10–27 дней после заражения с изгнанием его из матки через 50 дней. Следует иметь в виду, что вследствие аутолиза не всегда удается выделить вирус или выявить его геном в пробах, поэтому истинное количество абортов на этой стадии установить сложно.

Некоторая часть плодов выживает, вырабатывает иммунный ответ к вирусу и очищается от него. Такие телята рождаются полностью сформированными физически и с наличием вируснейтрализующих антител до выпойки моло-

зива. Однако телята, инфицированные на этой стадии стельности, могут представлять риск возникновения ВД-БС КРС в старшем возрасте. По данным Munoz-Zanzi C.A. и соавт. [75, 76], телята, рожденные с вируснейтрализующими антителами на крупных молочных фермах Бразилии, в два раза чаще заболевали в первые 10 мес. жизни, имели низкий коэффициент осеменения и не получали племенного статуса в сравнении с телями, рожденными серонегативными.

Оплодотворение у 10-месячных телок с высокими титрами антител к вирусу наступает на 32 дня позже, чем у животных с низкими титрами антител или их отсутствием. Инфицирование телок в возрасте 5–6 мес. и высокие титры антител, выявленные за месяц до осеменения, не влияют на оплодотворение. Большое значение для прогноза патологии воспроизводства в старшем возрасте имеет выявление вируснейтрализующих антител у новорожденных телят до выпойки молозива.

Патологические состояния, вызванные вирусом ВД-БС КРС, в молочном стаде, насчитывающем в среднем 200 коров, в период активной циркуляции вируса могут распределиться следующим образом: abortion — 52%, уродства — 58%, эмбриональная смертность — 32%, бесплодие — 45%, маститы — 42% и рождение слабых телят — 94% [36].

**Смешанные репродуктивные болезни, протекающие с участием вируса ВД-БС КРС.** Смешанные инфекции, вызванные вирусом ВД-БС КРС, вирусом ИРТ КРС, *Leptospira borgpetersenii* серовара *hardjo*, *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus*, *Arcanobacterium pyogenes*, а также грибами и *Neospora caninum* обычно приводят к увеличению количества абортов и более тяжелым поражениям у abortированных плодов, чем при monoинфекциях [36, 55, 86].

В данном случае иммуносупрессия, вызываемая вирусом ВД-БС КРС у коров и телок или у плода, может усиливать тяжесть поражения плода или способствовать активизации и усилению, а также проникновению через плацентарный барьер условно-патогенных микроорганизмов [55].

**Болезни желудочно-кишечного тракта.** Доказана прямая и косвенная роль вируса ВД-БС КРС в возникновении диареи у неонатальных телят в полевых условиях. Острая инфекция новорожденных животных может приводить к возникновению энтерита, который чаще развивается у телят, не получавших молозива от иммунных матерей. Интенсивность проявления клинических признаков болезни напрямую зависит от своевременности и количества выпитого молозива. У таких телят вследствие иммуносупрессивного действия вируса могут возникать различные болезни, вызванные другими вирусами или условно-патогенными бактериями, а клинические проявления болезни будут зависеть от природы суперинфицирующего инфекционного агента [36].

**Смешанные инфекции желудочно-кишечного тракта,** протекающие с участием вируса ВД-БС КРС. Вирус косвенным путем усиливает патогенетический эффект рота- и коронавирусов КРС. Энтерит, вызванный вирусом ВД-БС и бактерией *Salmonella enterica* серовара *Typhimurium*, протекает тяжелее, и бактерия выделяется дольше, чем при инфицировании без участия вируса [33]. В некоторых случаях вирус ВД-БС КРС усиливает тяжесть течения коронавирусной зимней дизентерии коров. Подобно своему поведению при респираторных болезнях молодняка, вирус подавляет иммунные функции организма в целом, а также эпителия желудочно-кишечного тракта, что приводит к усилению тяжести течения смешанных инфекций [36, 37, 80].

**Вирусная диарея и респираторные болезни.** Вирусы ВД-БС не являются прямыми респираторными патогенами, а их роль в возникновении клинических признаков респираторных болезней зависит от ряда факторов, включающих вирулентность инфицирующих штаммов, форму инфекции (острая или персистентная), время инфицирования животного (внутриутробное или постнатальное), иммуносупрессию, а также наличие вторичных патогенов. Не всегда удается установить истинную роль вируса в практических условиях, так же как и трудно разработать дизайн опытов в контролируемых исследованиях, которые могли бы воспроизвести весь спектр многочисленных факторов, способствующих возникновению респираторных болезней в естественных условиях [11, 36, 85].

**Роль персистентно инфицированных животных в возникновении респираторных болезней.** Поскольку ПИ телята подвержены более высокой заболеваемости и летальности в сравнении с неинфицированными животными, часть респираторной патологии может быть связана с болезнями этой категории животных, т.к. они чаще заболевают желудочно-кишечными и респираторными болезнями. При количестве ПИ телят, поступающих на фидлоты, равном 0,5% от общей численности КРС, падеж откормочных бычков достигает 2,5–5% [68]. Ввод в стадо молодняка молочного направления от 2 до 5% ПИ телят на 40% повышает риск возникновения респираторных болезней в нем и на 15% повышает летальность от них [11, 85]. Телята, инфицированные *in utero* на поздних стадиях стельности и не являющиеся ПИ, также предрасположены к возникновению респираторных болезней.

**Роль животных, не подвергшихся внутриутробному инфицированию.** Главным свойством острых форм вирусной диареи

в постнатальный период является потенцирование активности возбудителей вторичных инфекций, осуществляемое двумя путями: при помощи иммуносупрессии и явления синергизма [11, 86].

Иммуносупрессия, связанная с инфекцией вирусом ВД-БС КРС. Иммуносупрессия, сопровождающая острые формы ВД-БС КРС, является результатом прямого воздействия вируса на лимфоидные клетки, приводящего к их гибели или снижению функциональных способностей [36, 86].

Инфицирование низко- и высоковирулентными штаммами вируса приводит к снижению уровня циркулирующих лейкоцитов и лимфоцитов и истощению лимфоидной ткани, механизм которого до конца не изучен. Различия в патологии, вызванной высоково- и низковирулентными штаммами, заключается в выраженности гибели клеток или их истощения, снижении количества циркулирующих лимфоцитов, степень которых выше после инфекции высоковирулентными штаммами [36, 65, 66, 86].

Снижение количества циркулирующих лимфоцитов может быть результатом их выхода из крови в ткани, пониженного лейкогенеза или прямой гибели клеток. Высокий процент апоптоза лимфоцитов у животных, инфицированных высоковирулентными штаммами вирусов, вероятно, связан с гибелю клеток [65, 66].

Кроме того, инфекция вирусами ВД-БС нарушает функционирование врожденной и приобретенной иммунной системы. Вирус подавляет выработку интерферона, фагоцитоз, хемотаксис и бактерицидную активность. Со стороны приобретенного иммунного ответа регистрируются снижение регуляции (подавление) главного комплекса гистосовместимости 2 типа (МНС II), интерлейкина 2 (IL-2), супрессия реакции

Т-хеллеров, лейко- и лимфопения [36, 65, 66, 86].

**Эффект синергизма.** Явление синергизма происходит, когда взаимное усиление двух и более инфекционных агентов приводит к изменению патогенеза или усилинию тяжести течения болезни (табл. 1). Синергетические взаимодействия описаны для вирусов ВД-БС и нескольких других вирусных и бактериальных патогенов [11, 36, 86].

Таблица 1. Синергетические взаимодействия вирусов ВД-БС КРС с другими возбудителями вирусной и бактериальной природы в патогенезе респираторных болезней [86]

Тип патогенов	Вирусные патогены (вирусы)	Принцип взаимодействия
Вирусы	Вирус инфекционного ринотрахеита (BHV-1)	Синергизм, приводящий к изменению патогенеза/диссеминации возбудителей в организме/усилению тяжести течения болезни
	Респираторно-синцитиальный вирус (BRSV)	
	Вирус парагриппа-3 (PI-3)	
	Коронавирус (BCoV)	
Бактерии	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Синергизм, приводящий к усилению патогенеза смешанной инфекции. Иммуносупрессия, приводящая к активизации условно-патогенных микроорганизмов. Острые инфекции респираторного тракта
	<i>Pasteurella multocida</i> A и D	Синергизм, приводящий к усилению патогенеза смешанной инфекции/диссеминации возбудителей в организме. Иммуносупрессия, приводящая к активизации условно-патогенных микроорганизмов, хронические инфекции респираторного тракта
	<i>Mycoplasma bovis</i>	Синергизм, приводящий к усилению патогенеза смешанной инфекции/диссеминации возбудителей в организме. Иммуносупрессия, приводящая к активизации условно-патогенных микроорганизмов. Хронические инфекции респираторного тракта

Синергизм может осуществляться несколькими путями в зависимости от коинфицирующего возбудителя и тка- ни-мишени (респираторная, лимфоидная, кишечная и др.). Одним из его последствий является повышение вирулентности и увеличение степени распространения коинфицирующих патогенов в тканях организма, приводящие к усилению клинических признаков болезни и повышению уровня летальности [65, 66, 86].

Часто происходит взаимное усиление патогенности вирусов ВД-БС и ИРТ, приводящее к более тяжелому течению респираторной болезни и осложнению бактериями семейства *Pasteurellaceae* и микоплазмами [11, 86].

**Патогенез и клинические признаки.** В 90% случаев ВД-БС КРС протекает в виде острых «транзитных» форм инфекции без видимых или с наличием слабых (умеренных) клинических

признаков [36]. Термин «острые» инфекции используется для описания клинического или субклинического заболевания, возникающего у иммунокомпетентного не ПИ скота после контакта с вирусом [36].

После кратковременного контакта с животным, выделяющим возбудитель, происходит инфицирование слизистой оболочки носа животного. Затем вирус распространяется к миндалинам и регионарным лимфатическим узлам, а от-

туда передается в другие эпителиальные и лимфоидные ткани главным образом с помощью циркулирующих лимфоидных клеток. Инкубационный период составляет от 6 до 12 дней, а виремия — до 15 дней, но может быть дольше (до 3 недель) в зависимости от вирулентности штамма вируса, наличия стрессов и вторичных патогенов [36]. В период виремии вирус разносится по различным органам и тканям организма и может преодолевать плацентарный, гематоэнцефалический и гематотестикулярный барьеры. Возбудитель размножается в эпителии языка, пищевода, кишечника, бронхов, кожи, кровеносных сосудов, а также в фагоцитарных клетках лимфатических узлов, пейеровых фолликулах, миндалинах и селезенке, лимфоидной ткани взрослых животных и развивающихся эмбрионов [36, 55, 66, 67, 86]. Сохранение вируса происходит в мононуклеарных фагоцитарных клетках лимфоидной ткани.

Присутствие вируса не связано с поражениями нелимфоидных органов и тканей (легкие, печень, почки, поджелудочная железа, testики, сердце, матка), поэтому изменения в них не обязательно являются следствием размножения вируса, а зависят от реакции организма животного на инфекцию вирусом. Введение животным живых вакцин может приводить к кратковременной и проходящей иммуносупрессии [66, 85, 87].

Длительность виремии и сроки выделения вируса дольше после инфицирования высоковирулентными штаммами, чем низковирулентными [36]. По истечении этого срока животные выздоравливают, перестают выделять вирус, и у них начинается выработка специфических антител и Т-клеток, что приводит к пожизненному иммунитету, но только к инфицирующему штамму вируса [36, 86].

Результатом острой формы инфекции, вызванной вирусом ВД-БС КРС, является разрушение лимфоидных тканей и иммуносупрессия. При инфицировании телят как вирулентными, так и низковирулентными штаммами вируса происходит распространение вируса в широком диапазоне лимфоидных тканей и ее истощение. При этом существует четкая корреляция между степенью распространения вируса по лимфоидным тканям организма и интенсивностью ее поражений. При инфицировании высоковирулентным штаммом вируса апоптоз и истощение лимфоцитов выявляется во всех тканях. После заражения низковирулентными штаммами вируса выраженное истощение лимфоидных тканей исчезает после удаления вируса из них и последующего выздоровления животного [36, 86].

При энтеритах телят вирус непосредственно вызывает атрофию эпителия в двенадцатиперстной кишке и подслизистое воспаление органов брюшины. Клетки респираторного тракта не являются основным местом replikации вируса, однако в некоторых случаях инфекция вирусами приводит к повреждению эпителия респираторного тракта, но чаще к истощению лимфоидной ткани, связанной с органами дыхания [36].

Механизм иммуносупрессивного действия вируса является многофакторным и включает лейкопению, снижение пролиферации лимфоцитов, истощение лимфоидной ткани, понижение хемотаксиса и фагоцитарной активности, повышение выработки простагландинов Е2 и нарушение выработки провоспалительных цитокинов [83, 85, 86, 88], которая носит транзитный (2–3 недели) либо длительный характер у ПИ животных. Мишенями для вируса являются макрофаги и лимфоциты. Острая форма ВД-БС приводит к развитию транзитной лейкопении и

истощению лимфоидных тканей, снижению количества В-лимфоцитов, CD-4+, CD-8+ Т-лимфоцитов и нейтрофилов [36, 49, 66, 67, 85, 86, 88].

**Клинические признаки транзитной вирусной диареи** встречаются редко и могут быть различными в зависимости от инфицирующего штамма, возраста, иммунного и репродуктивного статуса животных. У телят или стельных животных, не иммунных к вирусу, они могут не проявляться вообще или проявляться в виде транзитного повышения температуры тела, выделений из носа, отказа от корма и кратковременной диареи. Однако эти инфекции практически всегда влияют на продуктивность животных и приводят к снижению надоев, скорости роста и привесов у молодняка разных возрастов, снижению оплодотворяющей способности у быков и коров [36, 55].

Смертность в результате ТИ очень низкая, за исключением вспышек геморрагического синдрома, вызванных НЦП штаммами (до 50%). В тех случаях, когда вспышки ВД-БС происходят в сочетании с вторичными инфекциями, что часто происходит при респираторных болезнях, падеж телят может достигать 50–80%, особенно при введении новых животных с неизвестным иммунным статусом в хозяйство и смешивании их с местными животными [3, 11, 36, 49, 85, 86].

**Клинические признаки перsistентной инфекции** у животных практически не проявляются. У них регистрируют по жизненно виремию и иммуносупрессию. Они могут выглядеть физиологически здоровыми, но отставать в росте в сравнении со своими сверстниками и погибать от желудочно-кишечных, респираторных болезней, вызванных другими инфекционными агентами, или от болезни слизистых оболочек (рис. 3).



Рис. 3. Перsistентно инфицированный теленок — постоянный источник возбудителя в стаде (фото Глотова А.Г.)

**Болезнь слизистых оболочек.** Продолжением перsistентного инфицирования может быть болезнь слизистых оболочек (смертельное заболевание, которое обычно регистрируется у КРС в возрасте от 6 мес. до 2 лет). Подверженны только ПИ животные, доля которых в стаде или популяции КРС не превышает 3% [36, 55, 85, 86].

Она возникает, когда животное, перsistентно инфицированное НЦП вирусом, суперинфицируется гомологичным ЦП вариантом вируса («вирусная пара»), что является обязательным условием. Болезнь может быть результатом введения ПИ животным живых вакцин, содержащих гомологичный ЦП штамм вируса, но в большинстве случаев развитие болезни ЦП вирус происходит из НЦП путем мутаций [36, 39, 87].

Инкубационный период составляет 7–14 дней. Течение болезни может быть острым (от 2 дней до 3 недель), или хроническим, когда животные доживают до возраста 24 мес. Клинические признаки болезни включают лихорадку, отказ от корма, прогрессирующее исхудание, тахикардию, учащенное дыхание, снижение молочной продуктивности и профузную водянистую диарею. Каловые массы зловонные, в них часто присутствуют кусочки слизистой оболочки и фи-

брин. Остальные признаки напоминают острые формы инфекции, но более выраженные. На слизистой оболочке языка, неба и десен могут быть эрозии и язвы. Сосочки ротовой полости также изъязвлены и геморрагически воспалены. В межкопытной щели, сосках, вульве и препуции регистрируют эрозии. Могут быть ламиниты. Дополнительными клиническими признаками являются выделения из носа и глаз, гиперсаливация, понижения сокращений рубца, отек роговицы.

У больных животных обычно выявляют нейтропению (без сдвига влево) и тромбоцитопению. Обычно они становятся более восприимчивыми к развитию вторичных бактериальных инфекций, что клинически проявляется в виде пневмоний, маститов и метритов. Летальность при этой форме составляет обычно 100%, что при определенных обстоятельствах может служить хорошим признаком, т.к. с гибелю таких животных исчезает постоянный эндогенный источник вируса в стаде. Однако некоторая, значительно меньшая часть больных животных выживает после признаков острой формы болезни слизистых оболочек, но впоследствии может погибнуть и от хронического проявления этой болезни [36, 39, 87].

*Хроническая болезнь слизистых оболочек.* Небольшая пропорция животных выздоравливает от острой формы болезни, но у них развиваются признаки хронической болезни слизистых оболочек. У таких животных обычно регистрируют длительную постоянную или перемежающуюся диарею, прогрессирующее исхудание, межпальцевые эрозии, эрозивные поражения кожи. Могут встречаться выделения из глаз и носа, образование алопеций и гиперкератизация кожи вокруг головы и шеи, хронические ламиниты и ненормальный рост копытной стенки. Со стороны картины кро-

ви выявляют анемию, нейтропению и тромбоцитопению [36, 39].

**Патологоанатомические изменения.** При острых транзитных формах инфекции видимые изменения во внутренних органах животных часто бывают минимальными и зависят от осложняющих течение ВД-БС инфекционных агентов. Однако при острых формах инфекции, вызванных BVDV-2, сопровождающихся выраженной иммуносупрессией, у животных регистрируют увеличение лимфатических узлов, истощение лимфоидной ткани, эрозии и язвы на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта, нередко с петехиальными кровоизлияниями. У мертвbornенных, а также телят, павших от острой формы инфекции, регистрируют скопление жидкости соломенного цвета в сердечной сорочке [36, 55].

Посмертные изменения во внутренних органах животных, павших от острой болезни слизистых оболочек, включают различные некротизированные язвы на протяжении всего желудочно-кишечного тракта (пищевод, рубец, съчуг, 12-перстная кишка, прямая кишка и другие). Эрозии могут присутствовать и на слизистой оболочке носовых ходов и верхнего отдела респираторного тракта. Пейеровы фолликулы тонкого отдела кишечника часто некротизированы и геморрагически воспалены. Содержимое кишечника обычно водянистое и зловонное [36, 39].

**Диагностика болезни.** Диагностические подходы можно разделить на две условных части [45, 46]:

1. Диагностика болезни у отдельных животных или их групп при подозрении на ВД-БС КРС в стаде, где регистрируются клинические признаки, описанные выше.

2. Плановые широкомасштабные диагностические исследования при реализации программ ликвидации болез-

ни, основанные на выявлении и удалении ПИ животных.

Клиническая и патологоанатомическая диагностика болезни затруднены по причине отсутствия выраженных изменений во внутренних органах. Лишь в редких случаях возможна постановка диагноза на ВД-БС КРС на основании данных эпизоотологических и клинических исследований. Учитывая то, что ВД-БС может протекать без видимых клинических признаков или в виде повторных осеменений, абортов или мумификации плода, врожденных дефектов, энтеритов, респираторных болезней и иммуносупрессии, диагноз на основании данных эпизоотологии, клинических признаков и патологоанатомического вскрытия трупов животных может носить только предварительный характер. Поэтому диагностика ВД-БС КРС возможна только на основании результатов лабораторных исследований.

Для того чтобы использовать эффективные диагностические методы, необходимо синхронизированное понимание причин лабораторных исследований как у практикующего ветеринарного врача, так и у сотрудников лабораторий. Это важно, так как не все доступные диагностические тесты могут найти применение во всех ситуациях. На практике необходимо установить причину наблюдаемых синдромов и провести предварительные дифференциальные исследования в хозяйстве с целью исключения болезней, протекающих со сходной симптоматикой.

Как правило, диагностические тесты используются в следующих ситуациях: (когда необходимо исключить присутствие вируса у животных):

- острые инфекции с иммуносупрессией (желудочно-кишечные, респираторные болезни, геморрагический синдром, болезнь слизистых оболочек);
- репродуктивные нарушения;

– выявление персистентно инфицированных животных;

– изучение напряженности иммунитета после вакцинации;

– контроль качества биологических продуктов (сыворотка эмбриона коровы, использующаяся для культивирования культур клеток и производства вакцин и др.);

– генотипирование возбудителя.

**Дифференциальная диагностика.** Дифференциальная диагностика острых форм ВД-БС КРС у взрослого скота должна проводиться с учетом дефицита меди, недостатка селена (усиливает течение острой ВД-БС КРС), отравления мышьяком, чумы КРС, зимней дизентерии КРС, паратуберкулеза, микотоксикозов, желудочно-кишечных паразитов, инфекционного ринотрахеита КРС и абортов неинфекционной природы.

При поражении ротовой полости животных необходимо исключить злокачественную катаральную горячку, блютантг, везикулярный стоматит, ящур, чуму крупного рогатого скота.

Дифференциальная диагностика дигареи новорожденных телят включает в себя рота-коронавирусные инфекции, криптоспоридиоз, колибактериоз, сальмонеллез, клостридиозы и кокцидиоз.

При проявлении клинических признаков респираторной болезни необходимо исключить инфекционный ринотрахеит, респираторно-синцитиальную инфекцию, инфекции, вызванные бактериями родов: *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Salmonella*, *Mycoplasma*, а также *Histophilus somni*.

**Лабораторная диагностика. Материал для исследований:** лимфоидные органы (лимфатические узлы, тимус, селезенка, пейеровы фолликулы), носовые, глазные и вагинальные выделения, сперма, лимфоидные и паренхиматозные органы плода, цельная кровь и сыворотка крови. Для серологической ретроспективной диагностики: парные пробы сы-

воротки крови, отобранные от больных и переболевших животных с интервалом 30 дней. Большую роль в успешной диагностике играют условия транспортировки и хранения биоматериала, вид транспортной среды. Пробы биоматериала должны отбираться не позднее 2–4 ч. после гибели или вынужденного убоя животных и транспортироваться в диагностическую лабораторию в термосе со льдом. Следует иметь в виду, что пробы фекалий не должны рассматриваться как первичный объект для диагностических исследований.

**Острые формы инфекции.** Выделение вируса должно проводиться в течение первых 3–10 дней после появления первых клинических признаков болезни. Материал от некоторых животных может содержать вирус только в пределах 2–3 дней после заражения. Для выделения вируса от животных, больных острыми формами инфекции, используют пробы цельной крови, лейкоцитов или сыворотки, а также тампонные пробы носовых выделений и со слизистых оболочек.

Материал от абортировавших животных и особенно от абортированных плодов часто не содержит вируса, поэтому для подтверждения внутриутробной инфекции исследуют парные пробы сыворотки крови от абортировавших матерей на наличие специфических антител к вирусу. Диагностика врожденных уродств осуществляется при помощи выделения вируса и серологических исследований для выявления специфических антител у телят до выпойки им молозива.

**Перsistентная форма инфекции.** Для выявления ПИ животных используют микрометод выделения вируса из проб сыворотки крови, ПЦР или ИФА. Учитывая наличие колостральных антител у телят до 3 мес., выделение вируса проводят из лейкоцитарной фракции

цельной крови. Диагноз на перsistентную форму инфекции устанавливают только при двукратных положительных результатах выделения вируса или обнаружении его нуклеиновой кислоты методом ПЦР в парных пробах крови или ее сыворотки. Параллельно исследуют пробы сыворотки крови на наличие вируснейтрализующих антител к вирусу. В случае выявления сероконверсии животное считается переболевшим острой формой ВД-БС КРС.

**Выделение вируса.** Наиболее надежным методом для диагностики ВД-БС КРС является выделение вируса в культурах клеток с последующей идентификацией полученного изолята, считающимся референтным («золотой стандарт диагностики»). Идентификация ЦП изолятов проводится с помощью моноспецифических поли- или моноклональных сывороток. Учитывая то, что около 90% изолятов вируса представляют НЦП биотип, после завершения процедуры выделения вируса в культуре клеток она должна быть проверена на его присутствие. Обычно это осуществляется при помощи метода флуоресцирующих антител с использованием моно- или поликлональных антител, иммунопероксидазного окрашивания монослоя культуры клеток или ОТ-ПЦР.

Выделение вируса проводится в первично-трипсинизированных культурах клеток почки эмбриона коровы, почки теленка, testicул бычков и перевиваемых линиях КСТ, кожи лошади, MDBK и BT (*Bovine turbinate*), обладающих наибольшей чувствительностью и свободных от «случайного» вируса. Цитопатогенное действие вируса проявляется в виде мелкоочаговой мелкозернистой дегенерации клеток, округлении, истончении, разрыве монослоя и отслоении клеток. В некоторых случаях наблюдают вакуолизацию цитоплазмы пораженных клеток.

В период виремии вирус можно изолировать из носовых выделений, лейкоцитов периферической крови, легких и фекалий. Для выделения вируса можно использовать пробы спермы, крови, сыворотки, органов плодов. Однако присутствие антител к вирусу может отрицательно влиять на результаты выделения вируса из проб сыворотки крови и сгустка крови.

**Выявление антигена.** Выявление антигена вируса в пробах от животных значительно быстрее и дешевле, чем выделение вируса. Однако методы прямого обнаружения антигена вируса не могут служить окончательным диагностическим методом, т.к. используются чаще в качестве методов скрининга. Для этих целей используют методы ИФА, направленные на выявление антигена, и иммунологическое окрашивание свежих или фиксированных формалином и залитых парафином тканевых срезов. В последнее время получило широкое распространение иммуногистохимическое окрашивание срезов кожных биоптатов уха (ушных выщипов).

**Полимеразная цепная реакция.** ПЦР, основанная на обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), широко используется в качестве рутинного метода диагностики болезни. Теоретически в ней могут быть исследованы все возможные и предполагаемые для лабораторного исследования образцы от животного (молоко, сыворотка крови, цельная кровь, выделения, кожа, нативные и фиксированные формалином ткани и т.д.). Разработаны методики, позволяющие проводить учет реакции в режиме реального времени и определять количество РНК (Real time PCR). Потенциальные осложнения при проведении ПЦР связаны с получением ложноположительных результатов, что обуславливается контаминацией посторонними агентами.

**Серологические методы.** Выявление уровня антител у животных после естественного заражения или после иммунизации по-прежнему остается стандартным методом. Правильное использование серологических тестов регламентируется оценкой эффективности вакцинации, соответствия актов вакцинации и статуса стада на наличие инфекции вирусом ВД-БС КРС; установлением ретроспективного диагноза (установление роли вируса в развитии клинических признаков болезни).

В основном используются ИФА и реакция нейтрализации, являющаяся референтным методом серологической диагностики («золотой стандарт»). Результаты этих методов часто не согласуются между собой.

**Интерпретация результатов лабораторных исследований.** В соответствии со стандартом МЭБ, для установления диагноза острой инфекции необходимо выделить вирус в чувствительных культурах клеток или его геном в ПЦР и продемонстрировать сероконверсию, т.е. диагностический (4- и более кратный) прирост титров вируснейтрализующих антител к вирусу в парных пробах сыворотки крови. Выделение возбудителя с установлением сероконверсии у переболевших животных выдержит любую критику.

Отрицательные результаты серологических исследований в комбинации с выделением ЦП вируса будут свидетельствовать о болезни слизистых оболочек, а в комбинации с выделением НЦП вируса — персистентной вирусной инфекции.

**Иммунитет и специфическая профилактика.** Обеспечение высокого уровня защиты животных от инфекции вирусами ВД-БС КРС является сложной задачей из-за значительной гетерогенности штаммов вирусов, а также способности заражать плод и вызывать персистентные инфекции. В контролируемых опы-

так показана эффективность живых и инактивированных вакцин, стимулирующих высокий защитный уровень клеточного и гуморального иммунитета.

После естественной инфекции или введения живых вакцин у животных вырабатывается гуморальный иммунитет, направленный в основном на нейтрализацию вирусных белков E2 и NS2/3 (NS3 для ЦП вирусов) и частично E<sup>ms</sup> и E1. Имунизация убитыми вакцинами приводит к выработке сывороточных антител к белку E2, а иммунный ответ на белки NS2/3, E<sup>ms</sup> и E1 низкий или отсутствует вообще. Вероятно, основные нейтрализующие эпигопты являются конформационными и расположены в N-концевой части белка E2. Профилактика инфекций плода требует выработки высоких уровней Т и В-клеток. В ответ на введение вакцин у животных вырабатываются высокие уровни гуморального и клеточного иммунитета [36, 87].

В связи с тем, что гуморальный иммунный ответ легче выявить, для определения уровня поствакцинального иммунитета у отдельных животных и оценки популяционного (стадного) иммунитета используют реакцию нейтрализации вируса в культурах клеток или ИФА. Минимальные защитные титры вируснейтрализующих антител выявляются у животных через 3–4 недели после вакцинации и повышаются к 10–12 неделям. Титры антител после вакцинации у животных, как правило, ниже, чем после естественного заражения, но имеют сходные кривые выработки и полураспада [36, 87].

Клеточный иммунитет изучен слабее. Т-клеточный иммунный ответ достигает защитного уровня в отсутствии гуморального только после введения живых вакцин, что выражается в антиген-специфической активации субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4 $\phi$ , CD8 $\phi$  и гамма/дельта Т-клеток). ДНК-вакцины с ис-

пользованием последовательностей, кодирующих E2 и NS3, индуцируют Т-клеточный иммунный ответ.

Все известные к настоящему времени вакцины включают в основное цитопатогенные штаммы: NADL, *Singer (BVDV1a)*, WRL, *Oregon C24V (1b)*, 890, 53637 (2a) и др. Включение в состав вакцин штаммов второго вида существенно повысило эффективность вакцинации [38]. Вакцин против *Pestivirus H (BVDV3)* пока не разработано [87]. До сих пор неизвестно, какой уровень перекрестной защиты существует между видами и подгруппами (субтипов) вирусов при использовании существующих вакцин. Не разработаны также DIVA вакцины и соответствующие диагностические методики к ним, позволяющие проводить дифференциацию поствакцинальных и естественных антител.

**Контроль инфекции.** Учитывая то, что цикл рождения ПИ телят в неблагополучном стаде носит непрерывный и циклический характер, болезнь существует, пока в нем есть такие животные. После их полного удаления инфекция прекращается, поэтому суть программ контроля болезни основана на принципе разрыва цикла «ПИ/не ПИ мать — ПИ теленок». В настоящее время применяют три основных стратегии, эффективность которых зависит от региональных особенностей ведения животноводства, информированности ветеринарно-зоотехнических работников и наличия официальных или добровольных программ контроля или эradикации вируса [2, 18, 74, 87].

**Контроль болезни с помощью вакцинации.** В большинстве стран с развитым молочным и мясным скотоводством для контроля инфекции используют вакцинацию животных. Вакцинация преследует следующие цели: защита животных от острых форм инфекции, предотвращение диссеминации виру-

са среди восприимчивых животных, блокада инфекции клеток-мишеней желудочно-кишечной, респираторной, репродуктивной и лимфатической систем, защита развивающегося плода от инфицирования. Она, как правило, эффективна на уровне стада и отдельного животного и экономически обоснована, но инфицирование плода профилактирует не полностью [36, 38, 87]. Ее осуществляют при помощи долгосрочных программ. Эффект вакцинации будет выше при совпадении генетического профиля вакцинных и эпизоотических штаммов, циркулирующих в конкретном регионе. В любом случае нужно помнить, что вакцинация является вынужденной мерой и во многом зависит от точного знания эпизоотической обстановки в хозяйстве.

**Особенности вакцинации против ВД-БС КРС.** К заражению вирусами восприимчив серонегативный скот всех возрастов, но наиболее — серонегативные телята до 6 мес. и телки перед искусственным осеменением. В практических условиях новорожденные ПИ телята часто заражают своих сверстников в профилакториях и телятниках до первого введения вакцин. Поэтому цель вакцинации при этой болезни — предотвращение внутриутробного заражения плода и рождения ПИ телят [86, 87]. При выборе вакцины необходимо учитывать генетическое разнообразие вируса, а также то, что телята, инфицированные в последнем триместре стельности и особенно рожденные от первотелок, чаще заболевают диареей и пневмонией. Нужно принимать во внимание потенциальную иммуносупрессию некоторых живых вакцин при введении животным непосредственно до или после транспортировки, ослабленным и, особенно, ПИ телятам [87]. Схемы вакцинации телят против ВД-БС КРС различные.

Огромное значение при профилактике острых транзитных форм инфекции (диареи, респираторные болезни) имеет своевременная выпойка телятам полноценного по составу иммунного молозива от иммунных матерей. При гарантированной выпойке молозива длительность колострального иммунитета к вирусу может составлять 70–100 дней [87].

Теоретически оптимальным возрастом для введения вакцин телятам является 3–4 мес, однако на практике ситуация иная. Титры колостральных антител к вирусам у них снижаются до максимально низкого уровня или исчезают в разные сроки (10–15; 30–40; 60 дней и т.д.) в зависимости от конкретных условий фермы и циркуляции эпизоотических штаммов вирусов. Именно в эти периоды возникают вспышки массовых респираторных болезней, поэтому время вакцинации необходимо выбирать в каждом конкретном случае с учетом эпизоотической ситуации и сроков снижения титров антител [16, 41, 50, 87].

В настоящее время временные рамки для парентерального введения вакцин устанавливаются в период, когда титры колостральных антител снижаются до уровня, блокирующего выработку постvakцинального иммунитета, но недостаточно высокого для предотвращения инфицирования телят эпизоотическими штаммами, что создает временное окно для заражения животного. В зарубежной литературе период между снижением защитного уровня материнских антител и началом формирования собственного иммунного ответа на вакцины называется «окно восприимчивости», которое может находиться в возрасте от нескольких недель до 8 мес [16, 87].

Следует принимать во внимание сроки инфицирования другими вирусами, подбирать и вырабатывать оптимальные схемы с учетом компонентов, вхо-

дящих в состав поливалентных вакцин, т.е. в сторону более раннего введения препаратов. Иммунизация телят должна быть элементом программы вакцинации стада. Исходя из вышесказанного, срок первичной вакцинации телят выбирается конкретно для каждого хозяйства на фоне снижения или исчезновения материнских антител [14, 16]. Крайне необходимо прививать телок и коров перед искусственным осеменением (случкой).

**Живые вакцины.** Широкое применение получили живые вакцины, часто в сочетании с другими агентами, участвующими в этиологии желудочно-кишечной, респираторной и репродуктивной патологии КРС [36, 63, 87]. С 90-х годов прошлого столетия в их состав включили НЦП штаммы. Они были эффективными, но обладали потенциальной способностью вызывать иммуносупрессию и внутриутробную инфекцию у стельных животных. Внутриутробную инфекцию вызывал либо вакциненный штамм, либо «случайный» полевой вирус (особенно BVDV-2), контактируя с вакциной. Источником контаминации была сыворотка эмбриона коров, использовавшаяся при культивировании культур клеток. Кроме этого, вакцины, контактирующие с вирусом, способствовали распространению его в популяции животных. Это касалось живых и инактивированных биопрепарата. В последнем случае вирус-контаминалант не полностью инактивировался с помощью стандартных доз инактивирующих препаратов и при введении неиммунным животным вызывал вспышки болезни с летальным исходом [31]. Впоследствии эти недостатки были устранены.

Несмотря на то что вопрос об abortогенности живых вакцин до конца не решен, препараты, изготовленные на основе НЦП штаммов вируса, не рекомендуется вводить стельным животным,

не имеющим специфических антител к вирусам, либо использовать их в модифицированном или инактивированном виде. Так, например, мутантный вакциненный вирус с удаленным геном Npro и инактивированной активностью Erns не вызывал трансплацентарную инфекцию у стельных коров и индуцировал выработку иммунного ответа, сопоставимого с нативным вирусом [71].

Большинство современных живых вакцин содержат только ЦП штаммы вируса, так как они не проникают через плаценту и не приводят к формированию ПИ у плода. Они вызывают у привитых животных сильный гуморальный и клеточный иммунитет, профилактируют abortion практически на всех стадиях стельности, снижают инцидентность желудочно-кишечных и респираторных болезней. Защита плода от формирования ПИ у них достаточно высокая, но не полная [87]. Они более эффективны при профилактике острых форм инфекции и показывают высокую степень защиты от инфицирования серонегативных телок до первого осеменения, а также телят [5, 87]. Эффективность их значительно выше, чем инактивированных препаратов.

Таким образом, вакцинация — самый распространенный метод контроля инфекции на добровольной основе и используется в странах с развитым скотоводством при широком распространении инфекции и высокой серопозитивности животных к вирусам. В России, США, Канаде, странах Южной Америки разрешены все типы вакцин. В Европе применение живых вакцин не рекомендуется на неиммунных животных до 6 мес. стельности. Это связано с сомнительной эффективностью и безопасностью имеющихся вакцин, а также с неправильным их использованием [67].

В странах Европы существует опасение, что живые вакцины могут вызвать

у ПИ телят «болезнь слизистых оболочек». Учитывая, что процент таких особей в популяции КРС в среднем не превышает 1–3%, этот недостаток проявляется чрезвычайно редко, не является критическим для крупных молочных хозяйств и окончательно не подтвержден в практических условиях [11, 87].

Также маловероятна передача аттенуированных штаммов BVDV, входящих в состав живых вакцин, от иммунизированных к восприимчивым животным. Важным является выбор времени вакцинации животных перед искусственным осеменением (случкой). Чем ближе срок введения живых вакцин к начальной и средней фазам эструса, тем больше риск отрицательного воздействия, поэтому их необходимо вводить не позже 30 дней до осеменения. При наличии у животных иммунитета, полученного от предыдущих вакцинаций, риск вредного влияния отсутствует полностью. Ревакцинация стельных животных не приводит кabortам или нарушениям репродуктивных функций. Риск возникновения персистентной инфекции у плода после введения живых вакцин отсутствует, так как все они содержат в составе цитопатогенные штаммы, однако контаминация их случайными нецитопатогенными штаммами вирусов может привести к заболеванию, abortам и рождению ПИ потомства [98].

**Инактивированные вакцины.** Потенциальные проблемы, связанные с применением живых вакцин, стимулировали разработку инактивированных препаратов, которые можно вводить на любой стадии стельности, так как они лишены перечисленных выше недостатков [20, 87]. Однако по сравнению с живыми вакцинами они формируют короткий и более слабый иммунитет, поэтому необходимо вводить препарат несколько раз. Поствакцинальный иммунитет формируется в течение нескольких недель, в то

время как живые вакцины могут обеспечивать защиту в течение нескольких дней. Защита плода у них под вопросом и гораздо ниже, чем у живых вакцин. Иммуногенность инактивированных вакцин обычно повышают путем добавления различных адьювантов. Как правило, такие вакцины стимулируют выработку высокого уровня гуморального, но недостаточный уровень клеточного иммунитета [87].

Несколько лет назад в Европе выявили побочные эффекты инактивированной вакцины на основе адьювантов, которая при введении стельным коровам индуцировала выработку аутоантител, что привело к возникновению у телят «синдрома кровоточивости», или «неонатальной панцитопении», сопровождавшегося массовой их гибелью (около 4000 телят). Предполагалось, что адьюванты повысили уровень иммунного ответа не только на антигены вируса, но и на клеточный балласт, оставшийся после культивирования вакцинного вируса [62, 91]. Наличие такого отрицательного эффекта убитых вакцин настороживает и требует более тщательного подхода к их созданию. Тем не менее на рынке Европы присутствуют преимущественно инактивированные вакцины.

**Комбинированное применение вакцин.** Учитывая высокую иммуногенность, но потенциальные проблемы безопасности живых вакцин, применяют сочетание убитых и живых препаратов. Хороший эффект был показан при первичной иммунизации телок перед искусственным осеменением убитой вакциной с ревакцинацией живой [48, 73]. При этом для ежегодной ревакцинации рекомендовано использовать инактивированные препараты либо инактивированные штаммы, входящие в состав поливалентных живых вакцин.

Любая программа систематической вакцинации направлена на предотвра-

щение инфицирования новых животных, снижение уровня циркуляции вируса в стаде и повышение стадного иммунитета к вирусу. Вакцины не обладают быстрым и лечебным эффектами, поэтому рассчитаны на длительное применение. Обычно вакцинацию планируют в зонах широкого распространения вируса с высоким уровнем серопозитивности животных (60–95%), что свидетельствует о присутствии в стадах постоянного эндогенного источника в виде ПИ животных. Поэтому такие программы должны разрабатываться в первую очередь для крупных высоко-продуктивных молочных хозяйств или « mega-ферм » с разовым или периодическим вводом новых животных, наличием болезней телят и репродуктивных проблем взрослых животных.

Программа вакцинации считается эффективной, если базовый показатель репродукции инфекции ( $R_0$ )  $\leq 1$ , то есть когда одно инфицированное животное заражает менее одной восприимчивой особи в конкретной популяции в течение определенного периода времени. Иными словами, по окончании программы вакцинации количество ПИ животных должно равняться нулю или единице при условии напряженного иммунитета у 80–95% особей в стаде [13, 87]. На эти показатели влияют многочисленные факторы: размеры хозяйства, концентрация, перемещения и ввод новых животных, условия их содержания, кормления и другие. По мере достижения эффекта вакцинации снижается инцидентность репродуктивных, желудочно-кишечных и респираторных болезней.

Однако, несмотря на прогресс в разработке вакцинных препаратов, в практических условиях достичь 100%-ной защиты плода не удается [55, 87, 101]. Поэтому вакцинацию нельзя рассматривать как единственный метод управления и контроля инфекции, но

и отрицать невозможно. Ее с успехом используют для специфической профилактики острых форм инфекции, особенно в сочетании с другими возбудителями вирусной природы для снижения заболеваемости и падежа животных. При правильном выборе сроков первого введения и схемы иммунизации в целом она дает хороший эффект и является рентабельной [77].

В США зарегистрировано около 200 вакцин против данной болезни, однако при сорокалетнем применении их эпизоотическая ситуация в целом по стране не улучшилась, не снизилась и степень распространения инфекции (80). Это связано не только с неполным охватом поголовья вакцинацией, но и с уникальной способностью вирусов ВД-БС КРС инфицировать плод на стадии 18–125 дней стельности и формировать персистентную инфекцию. Постоянно нарождающийся ПИ молодняк в течение всей жизни способен заражать новых восприимчивых особей при отсутствии или даже при наличии высокого уровня популяционного иммунитета.

В стаде с высоким процентом иммунных животных несколько особей, больных острой формой ВД-БС КРС, с низкой долей вероятности смогут заразить неиммунную прослойку стада, поэтому являются кратковременным тупиковым источником вируса, т.к. не могут поддерживать его распространение длительное время. Заболевание в данном случае ограничивается отдельными группами животных. В этом аспекте ВД-БС КРС нельзя сравнивать с другими вирусными инфекциями, потому что только при 100%-ном уровне популяционного иммунитета можно предотвратить рождение ПИ телят, что трудно достичь в практических условиях по экономическим или хозяйственным причинам. Это можно осуществить в мелких хозяйствах, где доля ПИ животных низкая и

составляет 1–2%. Постоянная «иммунизация», происходящая при контакте с ПИ-носителями, в течение нескольких лет приводит к формированию стойкого иммунитета у оставшейся части скота и отсутствию эмбриональных инфекций у стельных коров. После гибели последнего ПИ животного формируется статус свободного от вируса стада, т.е. происходит его «самоочищение». По данным зарубежных авторов, для этого требуется около 7 лет [61]. Однако это невозможно осуществить в больших стадах, так как 100%-го уровня иммунитета у животных в практических условиях достичь нельзя из-за постоянного ввода и перемещений новых особей, что приводит к рождению ПИ телят в больших количествах. Поэтому стратегия, основанная только на применении вакцин, в плане ликвидации болезни полного успеха иметь не будет [10, 13, 18, 87].

В США часто практикуется вакцинация только племенных животных без систематической иммунизации всего стада. В такой ситуации в хозяйстве с энзоотическим течением вирусной диареи может происходить так называемая «естественная вакцинация» животных, источниками которой служат ПИ-носители. В результате у животных возникают острые формы инфекции, и они приобретают естественный и пожизненный иммунитет к штамму вируса, циркулирующему на ферме. Этот метод «иммунизации» считается худшим сценарием по некоторым причинам. Во-первых, не все животные будут инфицироваться до осеменения. Во-вторых, при длительном нахождении ПИ животных в стаде существует риск инфицирования стельных животных и рождения ПИ телят, что позволяет вирусу сохраняться. В-третьих, у транзитно инфицированных животных регистрируют снижение продуктивности (снижение надоев, роста и привесов у молодняка, иммуно-

супрессию, часто приводящую к возникновению вспышек респираторных болезней и другой патологии), что в конечном счете выражается в больших экономических затратах, чем при использовании вакцин. В-четвертых, ПИ животные могут погибать в раннем возрасте, что делает такую программу недолгосрочной. В-пятых, при наличии клинических форм инфекции с иммуносупрессией «естественная вакцинация» не приведет к образованию адекватного иммунитета, которого можно достичь с использованием вакцин [46]. В конечном счете по мере накопления возбудителя такая ситуация может привести к массовой вспышке болезни и свести на нет усилия по специфической профилактике с использованием вакцин, а также путанице при серологических исследованиях.

#### **Контроль без использования вакцин.**

С усовершенствованием диагностических технологий, а именно методов ИФА для детекции антигенов вируса и специфических антител к нему, а также ПЦР, позволяющей исследовать объединенные пробы, в 90-х годах XX века стало возможным проведение экономически рентабельных программ эradикации болезни [67]. Первая программа, начатая в Швеции в 1993 г., была добровольной, а позже обязательной по требованию молочной промышленности и поддерживалась правительством страны [60]. Аналогичным образом и в этот же период реализовалась программа в Норвегии, которую контролировали государственные ветеринарные власти [96], в 1994 г. — в Дании [35], в 2004 г. — в Австрии [94], а в 2008 г. — в Швейцарии [97]. Финляндия имела благоприятную ситуацию, так как в период осуществления программы между 1998 и 2004 гг. в стране насчитывались единичные инфицированные (неблагополучные) стада [90].

Основу этих программ составлял вирусологический скрининг, позволяющий выявлять, идентифицировать и уничтожать ПИ особей в конкретных стадах и даже популяциях животных, лишив их таким образом резервуара вируса. Появилась возможность с помощью серологического скрининга образцов сыворотки крови или сборного молока оценить статус отдельного животного или стада в отношении инфекции. Учитывая, что вакцинацию против ВД-БС КРС в этих странах никогда не проводили, можно было легко идентифицировать стада с активной вирусной инфекцией (установление циркуляции возбудителя с помощью ИФА). При получении положительного результата, свидетельствующего о недавней инфекции в стаде, переходили к этапу выявления и удаления ПИ животных. После этого осуществляли наблюдение и мониторинг, запрещая ввод животных в оздоровляемые стада и их передвижение в течение нескольких лет до полного оздоровления. Все скандинавские программы были экономически выгодными [74, 97]. Этому способствовало незначительное распространение болезни и содержание скота небольшими стадами. Так, например, на фермах Швейцарии среднее количество коров на ферме составляет около 47 голов [97].

При данном принципе контроля инфекции на заключительных этапах программы возникает серьезная проблема. Обычно в популяциях КРС с энзоотическим течением болезни серопозитивность животных к вирусу высокая и может превышать 90%. В такой ситуации ввод вирусоносителей (реинтродукция инфекции) не будет иметь серьезных последствий, так как в стаде практически отсутствуют неиммунные животные. При систематической выбраковке ПИ животных поголовье постепенно приобретает серонегативный статус и становится восприимчивым к

инфекции. Неконтролируемый ввод ПИ животных в такое стадо может привести к вспышкам болезни в короткие сроки. В данном случае необходим строгий контроль недопущения повторного заноса инфекции в оздоровленное стадо. Следует отметить, что, несмотря на различные условия в начале проектов с точки зрения юридической поддержки и независимо от начальных распространностей стад с ПИ животными, эти страны достигли полного или частичного благополучия примерно через 10 лет. Однако периодически возникают локальные вспышки инфекции из-за неконтролируемого перемещения скота [74, 97].

**Комбинированные программы контроля** основаны на выявлении, удалении ПИ животных и проведении последующей вакцинации. Первая добровольная программа без использования вакцин была начата в Германии в Нижней Саксонии в 80-х годах прошлого столетия, но потерпела неудачу из-за постоянного реинфицирования скота в оздоровленных стадах. Учитывая высокую плотность животных в некоторых районах страны (около 200 гол. на 1 км<sup>2</sup>), высокий уровень серопозитивности и интенсивную торговлю скотом, в 2004 г. болезнь была занесена в список инфекций, подлежащих обязательной регистрации, а с 2011 г. стартовала национальная программа контроля, основанная на выявлении и выбраковке ПИ животных. Основываясь на недостатках программ без использования вакцин, на заключительных этапах в них скот иммунизируют на добровольной основе [99].

Подобные программы осуществляются в Англии, Шотландии, Северной Ирландии, Бельгии, Голландии и нескольких штатах США (Колорадо, Алабама, Джорджия, Миссисипи, Монтана, Орегон, Вашингтон, Нью-Йорк и Верхний Мичиган) [56, 89, 97].

**Заключение.** В России при меняющейся стратегии ведения животноводства с акцентом на создание крупных молочных комплексов («мега-ферм»), в которые одноразово или постоянно вводят новых животных из других стран или регионов нашей страны, большую актуальность приобретают вопросы диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота.

В России программ контроля ВД-БС КРС федерального или регионального уровней не существует. В связи с этим широко используется иммунизация животных инактивированными и живыми вакцинами отечественных и зарубежных производителей. В литературе описаны разные стратегии контроля этой инфекции. При любом выбранном подходе следует помнить, что в настоящее время нет препаратов, обладающих 100%-ной эффективностью, поэтому вакцинация должна служить вспомогательным методом при контроле инфекции. При планировании и реализации профилактических мероприятий большое внимание должно уделяться соблюдению хозяйственных (технологических) принципов борьбы с болезнью: раздельное выращивание телок и содержание маточного поголовья (особенно стельного) и телят, выявление и выбраковка ПИ вирусоносителей. Необходимо также придерживаться политики «закрытия» стада, т.е. не допускать ввода в него новых животных.

Как правило, должна разрабатываться долгосрочная программа для конкретного стада, основанная на тщательном анализе способа ведения животноводства в хозяйстве и экономических показателей (затраты и прибыль). Затраты включают расходы на диагностические исследования, приобретение вакцин и наложение ограничений на хозяйство. Прибыль складывается из снижения потерь от пренатальной патологии, ди-

ареи и пневмоний у телят. Реализация таких программ повышает ценность племенных животных. Быки или ремонтные телочки, считающиеся по результатам исследований на наличие ПИ инфекции отрицательными, могут продаваться за более высокую цену, так же как и стельные животные, оцененные как имеющие низкий риск вынашивания ПИ плода и рождения ПИ теленка.

## Литература

1. Бучнев К.Н. Вирусное заболевание крупного рогатого скота с поражением слизистых оболочек. Вестник с-х науки Казахстана. 1967;7: 11–15.
2. Верховская А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Иванов Е.В. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота. Ветеринария. 2009; 8: 3–7.
3. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. Ветеринария. 2002; 3: 17–21.
4. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г. и др. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2009; 6: 43–47.
5. Глотов, А.Г., Краснов В.В., Глотова Т.И. Эффективность вакцинации при профилактике аборта, вызванных вирусом диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. Вестник КрасГАУ. 2010; 8: 89–94.
6. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Особенности проявления вирусной диареи — болезни слизистых оболочек у племенных быков. Ветеринария. 2012; 12: 3–6.
7. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пестивирусы крупного рогатого

- скота. Сельскохозяйственная биология. 2015; 50(4): 399–408. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.4.rus>.
8. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Вирусная диарея: значение в патологии воспроизведения крупного рогатого скота. Ветеринария. 2015; 4: 3–8.
9. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Пестивирусы жвачных животных. Вопросы вирусологии. 2016; 61(2): 59–62. doi: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-2-59-62>.
10. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В. и др. Индикаторы циркуляции возбудителей вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах в условиях Сибири. Сельскохозяйственная биология. 2016; 4(51):483–490.
11. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Роль возбудителя вирусной диареи — болезни слизистых оболочек в этиологии респираторных патологий крупного рогатого скота. Ветеринария. 2017; 6: 3–12.
12. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И. и др. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. Вопросы вирусологии. 2018; 63(4): 185–191. doi: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>.
13. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Стратегия и принципы контроля вирусной диареи крупного рогатого скота (обзор литературы). Ветеринария. 2018; 8: 3–12.
14. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А. Длительность и напряженность пассивного и приобретенного иммунитета к респираторным вирусам у крупного рогатого скота на молочных комплексах. Ветеринария. 2019; 1: 3–9. doi:10.30896/0042-4846.2019.22.1.03-09.
15. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В., Нефедченко А.В., Семенова О.В. Вспышка заболеваний крупного рогатого скота, вызванная вирусом диареи второго вида. Ветеринария. 2019; 3: 3–8. doi: 10.30896/0042-4846.2019.22.3.03-08.
16. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Влияние колострального иммунитета на эффективность вакцинации телят против вирусных инфекций (обзор литературы). Ветеринария. 2019; 6: 3–11. doi: 10.30896/0042-4846.2019.22.6.03-11.
17. Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И. Выявление и филогенетический анализ вируса диареи крупного рогатого скота двух видов при вспышке болезни на молочном комплексе. Ветеринария. 2019; 9: 13–19. doi:10.30896/0042-4846.2019.22.9.13-19.
18. Гюлюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей — болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах российской федерации. Вопросы вирусологии. 2013; 6: 13–18.
19. Жидков С.А., Лебедев А.И., Гоголев М.М., Коромыслов Г.Ф. Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 1995; 3: 50–53.
20. Концевая Н.Н., Соболева Г.Л., Непоклонова И.В., Алипер Т.И. Вакцины Комбовак 2+Л и Комбовак 4+Л для создания колострального иммунитета у молодняка крупного рогатого скота. Ветеринария. 2016; 5: 8–13.
21. Котенева С.В., Максютов Р.А., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Идентификация атипичного пестивируса крупного рогатого скота в биологических образцах. Сельскохозяйственная биология. 2017; 52(6): 1259–1264. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus>.
22. Котенева С.В., Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. Сельскохозяйственная биология. 2019; 54(1): 12–17. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.54.1.12-17rus>.

- хозяйственная биология. 2018; 53(6): 1238–1246. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus>.
23. Крюков Н.Н., Зудилина З.Ф., Юров К.П., Жидков С.А. О неспецифической профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота. Ветеринария. 1978;1: 37–40.
24. Макаревич В.Г., Назаров В.П. Чувствительность культур клеток к вирусу диареи крупного рогатого скота. Актуальные вопросы вет. вирусологии, изд. МВА.1967; ч. 2: 45–49.
25. Мищенко В.А., Черных О.Ю., Мищенко А.В. и др. Превалентность антител к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота в сыворотке крови жвачных животных. Ветеринария Кубани. 2012; 5: 19–20.
26. Нефедченко А.В., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Кунгурцева О.В. Выявление животных, персистентно инфицированных вирусом ВД-БС крупного рогатого скота, методом ПЦР. Ветеринария. 2011; 12: 21–25.
27. Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В. и др. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. Вопросы вирусологии. 2012; 5(57): 15–21.
28. Шилова Е.Н., Ряпосова М.В., Шкуратова И.А., Вяльых Е.В. Вирусная диарея — болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота в Уральском регионе. Ветеринария. 2014; 5: 19–21.
29. Южаков А.Г., Устинова Г.И., Глотов А.Г., Глотова Т.И. и др. Филогенетический анализ нецитопатогенных изолятов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота. Ветеринария. 2009; 6: 29–32.
30. Юров Г.К., Алексеенкова С.В., Диас Хименес К.А. и др. Антигенные свойства нецитопатогенных штаммов вируса диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота. Российский Ветеринарный Журнал. 2013; 2: 24–28.
31. Barkema H.W., Bartels C.J., van Wuijckhuise L. et al. Outbreak of bovine virus diarrhea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhea virus type 2. Tijdschr. Diergeneesk. 2001; 126(6):158–165.
32. Bauermann F.V., Ridpath J.F. Hobili-like viruses—The typical ‘atypical Bovine Pestivirus’. Anim. Health Res. Rev. 2015; 16: 64–69.
33. Becher P., Tautz N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular rna sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. RNA Biol. 2011; 8: 216–224.
34. Benavides B., Casal J., Diéguez J.F. et al. Development of a quantitative risk assessment of bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 introduction in dairy cattle herds to improve biosecurity. J. Dairy. Sci. 2020; 29: S0022-0302(20)30334-9.
35. Bitsch V., Hansen K.E., Ronsholt L. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994–1998 with special reference to legislation and causes of infection. Vet. Microbiol. 2000; 77: 137–143.
36. Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management, and Control. Edited by S. M. Goyal and J.F. Ridpath. — 2005. Blackwell Publishing Ltd. p. 261.
37. Brodersen B.W., Kelling C.L. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. Am. J. Vet. Res. 1998; 59(11): 1423–1430.
38. Brock K.V., McCarty K., Chase C.C., Harland R. Protection against Fetal Infection with Either Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 or Type 2 Using a Non-cytopathic Type 1 Modified-Live Virus Vaccine. Vet. Ther. 2006; 7(1): 27–34.
39. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J. Experimental production of fatal mu-

- cosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 1984; 114: 535–566.
40. Carman S., Van Dreumel T., Ridpath J. et al. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10: 27–35.
41. Chase C.C., Elmowalid G., Yousif A.A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20: 95–114.
42. Decaro N., Lucente M.S., Mari V. et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 1549–1552.
43. Deng M., Ji S., Fei W. et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS ONE.* 2015; 10: e0134777. doi: 10.1371/journal.pone.0134777.
44. Deregt D., Loewen K.G. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. *Can. Vet. J.* 1995; 36 (6): 71–78.
45. Dubovi E.J. Laboratory Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Biologicals.* 2013; 41(1): 8–13.
46. Evans C.A., Pinior B., Larska M. et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2018; Nov 11.
47. Fray M.D., Mann G.E., Clarke M.C., Charleston B. Bovine viral diarrhea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Veterinary Microbiology.* 2000; 77: 185–194.
48. Frey H.R., Eicken K., Grummer B. et al. Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination. *J. Vet. Med.* 2002; 49: 489–493.
49. Fulton R.W., Purdy C.W., Confer A.W. et al. Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus *Can. J. Vet. Res.* 2000; 64: 151–159.
50. Fulton R.W., Briggs R.E., Payton M.E. et al. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine.* 2004; 22: 643–649.
51. Gard J.A., Givens M.D., Stringfellow D.A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology.* 2007; 68(3): 434–442.
52. Givens M.D., Riddell K.P., Edmondson M.A. et al. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 2009; 139(1–2): 42–51.
53. Giannamarioli M., Ridpath J.F., Rossi E. et al. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals.* 2015; 43(4): 220–224.
54. Gregg K., Riddell K.P., Chen S.H. et al. Risk and prevention of bovine viral diarrhea virus (BVDV) transmission through embryo production via somatic cell nuclear transfer (SCNT) using oocytes from persistently infected donors. *Theriogenology.* 2010; 74(1): 1–10.
55. Grooms D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 2004; 20: 5–19.
56. Grooms D.L., Bartlett B.B., Bolin S.R. et al. Review of the Michigan Upper Peninsula bovine viral diarrhea virus eradication project. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2013; 243(4): 548–554.
57. Hamers C., Couvreur B., Dehan P. et al. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet. J.* 2000; 160: 250–258.

58. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*. 1999; 64: 89–107.
59. Haider N., Rahman M.S., Khan S.U. et al. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2014; 61: 193–198.
60. Hult L., Lindberg A. Experiences from BVDV control in Sweden. *Prev. Vet. Med.* 2005; 72:143–148.
61. Kampa J., Alenius S., Emanuelson U. et al. Bovine herpesvirus type 1 (bhv-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: Self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. *Vet. J.* 2009; 182: 223–230.
62. Kasonta R., Sauter-Louis C., Holsteg M. et al. Effect of the vaccination scheme on Pregsure(R) BVD induced alloreactivity and the incidence of bovine neonatal pancytopenia. *Vaccine*. 2012; 30: 6649–6655.
63. Kelling C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet. Clin. Food Anim.* 2004; 20: 115–129.
64. Kummerer B.M., Tautz N., Becher P. et al. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 2000; 77: 117–128.
65. Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.F., Neill J.D. Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus sub-clinical acute infection with BVDV2. *Biologicals*. 2003; 31: 119–122.
66. Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.E., Neill J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004; 16: 388–396.
67. Lindberg A., Brownlie J., Gunn G.J. et al. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech.* 2006; 25(3): 961–979.
68. Loneragan G.H., Thomson D.U., Montgomery D.L. et al. Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 595–601.
69. Mao L., Li W., Zhang W. et al. Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *J. Virol.* 2012; 86(22): 12444.
70. Makoschey B., van Gelder P.T., Keijzers V., Goovaerts D. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals*. 2003; 31: 203–208.
71. Meyers G., Ege A., Fetzer C. et al. Bovine viral diarrhea virus: Prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting ERNs rnase and Npro protease. *J. Virol.* 2007; 81: 3327–3338.
72. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A. et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 2014; 174: 239–246.
73. Moennig V., Eicken K., Flebbe U. et al. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev. Vet. Med.* 2005; 72:109–114.
74. Moennig V., Becher P. Control of Bovine Viral Diarrhea. *Pathogens*. 2018; 7(1): 29–41.
75. Munoz-Zanzi C.A., Hietala S.K., Thurmond M.C. et al. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhea virus in dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* 2003; 64: 358–665.
76. Munoz-Zanzi C.A., Thurmond M.C., Hietala S.K. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology*. 2004; 61: 1085–1099.
77. Newcomer B.W., Walz P.H., Givens M.D., Wilson A.E. Efficacy of bovine viral

- diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis. Theriogenology. 2015; 83: 360–365.
78. Oguejiofor C.F., Thomas C., Cheng Z., Wathes D.C. Mechanisms linking bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. Anim. Health. Res. Rev. 2019; 20(1): 72–85.
  79. Olafson P., MacCallum A.D., Fox F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell Veterinarian. 1946; 36: 205–213.
  80. O'Rourke K. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2002; 220: 1770–1773.
  81. Peterhans E., Schweizer M. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. Veterinary Microbiology. 2010; 142(1–2): 18–25.
  82. Pinior B., Firth C.L., Richter V. et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. Prev. Vet. Med. 2017; 137: 77–92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>.
  83. Platt R., Kesl L., Guidarini C. et al. Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela((r)) live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. Vet. Immunol. Immunopathol. 2017; 187: 20–27.
  84. Ramsey F.K., Chivers W.H. Mucosal disease of cattle. North. Am. Vet. 1953; 34: 629–634.
  85. Ridpath J.F. The Contribution of Infections with Bovine Viral Diarrhea Viruses to Bovine Respiratory Disease. Vet. Clin. Food Anim. 2010; 26: 335–348.
  86. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhea virus: global status. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 2010; 26: 105–121.
  87. Ridpath J.F. Immunology of BVDV Vaccines. Biologicals. 2013; 41(1): 14–19.
  88. Ridpath J.F., Fulton R.W., Bauer-mann F.V. et al. Sequential exposure to bovine viral diarrhea virus and bovine corona-virus results in increased respiratory disease lesions: clinical, immunologic, pathologic, and immunohistochemical findings. J. Vet. Diagn. Invest. 2020; 32(4): 513–552.
  89. Richter V., Lebl K., Baumgartner W. et al. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. Vet. J. 2017; 220: 80–87.
  90. Rikula U., Nuotio L., Aaltonen T., Ruoho O. Bovine viral diarrhoea virus control in Finland 1998–2004. Prev. Vet. Med. 2005; 72: 139–142.
  91. Sauter-Louis C.M., Staubach C., Reichmann F. et al. Spatial distribution and incidence of bovine neonatal pancytopenia in Bavaria, Germany. BMC Vet. Res. 2020; 16(1): 155.
  92. Simmonds P., Becher P., Bukh J. et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. J. Gen. Virol. 2017; 98: 2–3.
  93. Stevens E.T., Zimmerman A.D., Butterbaugh R.E. et al. The induction of a cell-mediated immune response to bovine viral diarrhea virus with an adjuvanted inactivated vaccine. Vet. Ther. Res. Appl. Vet. Med. 2009; 10: 1–8.
  94. Schoepf K., Revilla-Fernandez S., Steinrigl A. et al. Retrospective epidemiological evaluation of molecular and animal husbandry data within the bovine viral diarrhea virus (BVDV) control programme in Western Austria during 2009–2014. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2016; 129: 196–201.
  95. Schirrmeyer H., Strebelow G., Depner K. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. J. Gen. Virol. 2004; 85: 3647–3652.
  96. Valle P.S., Skjerve E., Martin S.W. et al. Ten years of bovine virus diarrhea virus (BVDV) control in Norway: A cost-benefit analysis. Prev. Vet. Med. 2005; 72: 189–207.
  97. Van Roon A.M., Santman-Berends I.M.G.A., Graham D. et al. Description

- and Qualitative Comparison of the Elements of Heterogeneous Bovine Viral Diarrhea Control Programs That Influence Confidence of Freedom. *J. Dairy. Sci.* 2020; 103(5): 4654–4671.
98. Walz P.H., Chamorro M.F., M Falkenberg S. et al. Bovine viral diarrhea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *J. Vet. Intern. Med.* 2020; 1–17.
99. Wernike K., Schirrmeier H., Strebelow H.G., Beer M. Eradication of bovine viral diarrhea virus in Germany—diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Vet. Microbiol.* 2017; 208: 2–29.
100. Yesilbag K., Alpay G., Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses*. 2017; 9(6): 128.
101. Zimmer G.M., Wentink G.H., Bruschke C. et al. Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 2002; 89: 255–265.

# КОРОНАВИРУСЫ КРС И ВЫЗЫВАЕМЫЕ ИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Власова А.Н., Сайф Л.

**Краткая аннотация.** Коронавирусы обладают самым большим и сложным геномом среди РНК-вирусов (длиной вплоть до 32кб), который кодирует в том числе последовательности 16 неструктурных белков, регулирующих синтез и модификацию РНК. Коронавирусы вызывают инфекционные заболевания у многочисленных видов млекопитающих и птиц, причем симптомы могут очень сильно варьироваться. Переменный тканевый тропизм и способность легко пересекать межвидовые барьеры стали «визитной карточкой» некоторых коронавирусов. Эти особенности коронавирусов во многом предопределили случившиеся в XXI веке пандемии тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и SARS-CoV-2, в свете которых значимость коронавирусов для здоровья человека трудно недооценить. Коронавирусы КРС (BCoVs) относятся к роду *Betacoronavirus* и вызывают диарею у новорожденных телят, а также зимнюю дизентерию и дорожную лихорадку у животных более старшего возраста. Примечательно, что ни генетических, ни антигенных маркеров у бычьих коронавирусов, наличие которых бы коррелировало с манифестиацией клинических признаков, идентифицировано не было. Напротив, как и другие коронавирусы, BCoVs существуют как квазивиды. Помимо КРС, BCoVs и похожие на них коронавирусы были идентифицированы в тканях различных домашних и диких жвачных животных: водяных буйволов, овец, коз, одногорбых верблюдов, лам, альпак, оленей,

антилоп, жирафов и диких коз, а также у собак и человека. Удивительно, что похожие коронавирусы не удается с достаточной степенью надежности отличить от BCoVs, используя инструменты сравнительной геномики. Также важно, что известны случаи зоонозной трансмиссии BCoVs. В настоящей статье речь пойдет о патогенезе инфекций, вызываемых BCoV, их эпидемиологии, межвидовой трансмиссии, иммунном ответе при заражении, а также вакцинопрофилактике и диагностике.

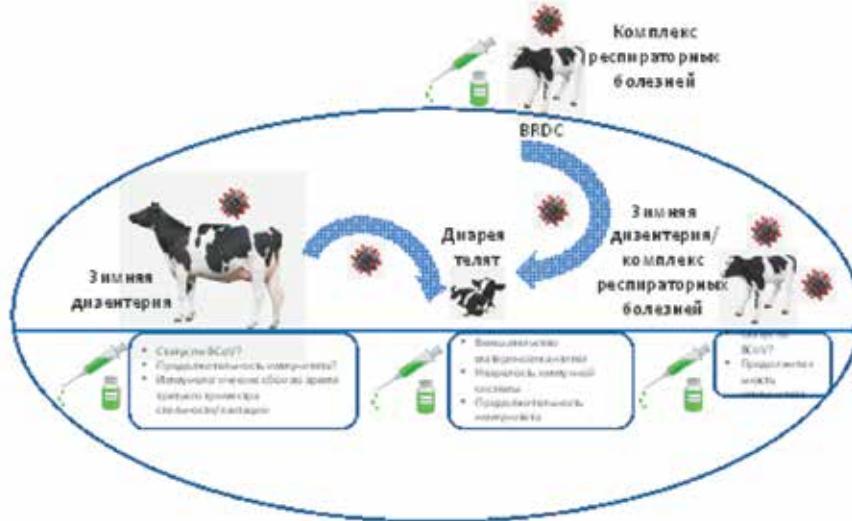
**Введение.** Коронавирусы (CoVs) — это оболочечные вирусы с самым большим РНК-геномом (26,4–31,7 кб), относящиеся к подсемейству *Coronavirinae* семейства Coronaviridae порядка *Nidovirales* (de Groot, Baker et al., 2012). В настоящее время коронавирусы подразделяют на четыре рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*, причем альфа- и бетакоронавирусы поражают только млекопитающих, а коронавирусы птиц относятся к другим двум родам (de Groot, Baker et al., 2012).

Коронавирусы заражают разнообразные виды млекопитающих и птиц, вызывая у них энтериты, респираторные заболевания, а также неврологические расстройства и расстройства печени (de Groot, Baker et al., 2012). XXI столетие уже предоставило нам многочисленные доказательства способности коронавирусов расширять свой ареал распространения и спектры хозяев. В качестве примеров можно назвать вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), а также продолжающиеся в настоящее время эпидемию ближневосточного ре-

спираторного синдрома (MERS-CoV) и пандемию новой коронавирусной инфекции человека SARS-CoV-2; появление вируса эпизоотической диареи свиней в обеих Америках, а также появление в Азии дельтакоронавируса свиней и его последующее распространение в США (Ksiazek, Erdman et al., 2003; Rota, Oberste et al., 2003; Drosten, Muth et al., 2015; Wang, Vlasova et al., 2019; Ralph, Lew et al., 2020). Способность быстро приспособливаться к новым хозяевам и экологическим нишам объясняются высокой скоростью мутаций (число мутаций в геноме на цикл репликации), имеющей причиной низкую надежность работы вирусной РНК-полимеразы (Drake and Holland, 1999), большой размер генома (Woo, Lau et al., 2009) и высокую частоту гомологичной рекомбинации в ходе репликации РНК, которая была подробно описана для нескольких коронавирусов свиней, кошек и собак (Decaro,

Mari et al., 2010; Terada, Matsui et al., 2014; Akimkin, Beer et al., 2016; Boniotti, Papetti et al., 2016; Mandelik, Sarvas et al., 2018). Коронавирусы являются единственными вирусами, у которых имеется механизм для коррекции генома (осуществляемой неструктурными белками 10–14), который позволяет им избежать катастрофических его изменений (Lauber, Goeman et al., 2013) и в то же время поддерживать существование разнообразного и жизнеспособного пула квазивидов.

Ряд коронавирусов человека (HCoVs), вызывающих насморк и острый гастроэнтерит, — HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 и кишечный CoV 44 (HECoV-44) были известны (Su, Wong et al., 2016) еще до того, как были описаны их молекулярные характеристики и появились диагностические инструменты, благодаря которым стала понятна эпидемическая/пандемическая при-



**Рис. 1. Схематичное изображение различных клинических синдромов, ассоциированных с коронавирусом КРС, и проблемы, связанные с успешной вакцинацией, для животных различных возрастных групп и производственных статусов.** Изображение коронавируса над животным означает потенциальный статус носителя. В прямоугольники заключены неизвестные факторы, связанные с хозяином и вакцинами, которые могут негативно повлиять на эффективность иммунизации или привести к отсутствию защиты среди животных разных возрастов

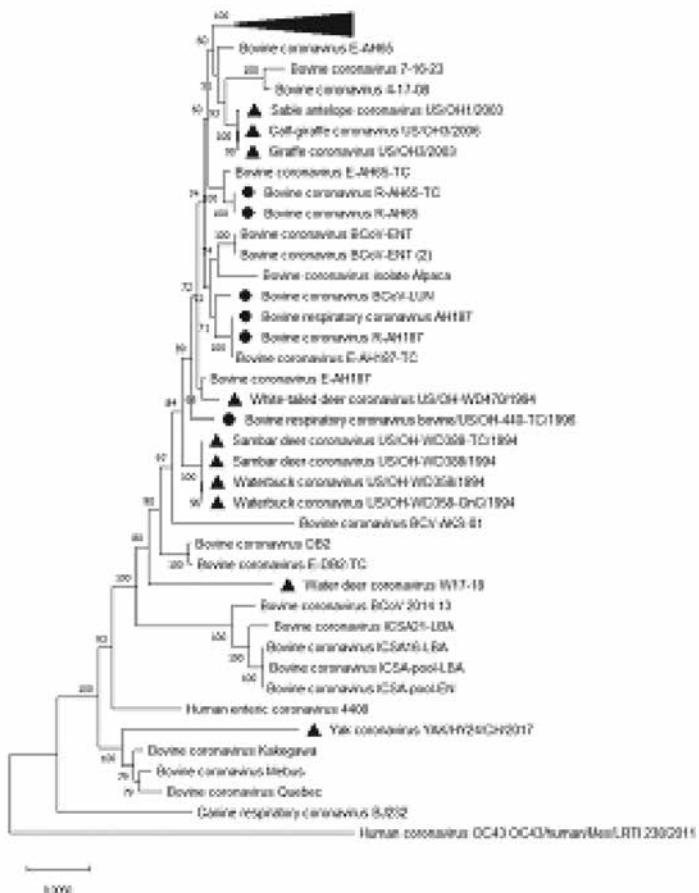
рода коронавирусов. Подозревалось, что некоторые из вызываемых ими заболеваний имеют зоонозную природу (Huynh, Li et al., 2012; Su, Wong et al., 2016), в том числе допускалась возможность передачи от КРС (HCoV-OC43 и HECoV-44) (Zhang, Herbst et al., 1994; Vijgen, Keyaerts et al., 2005; Su, Wong et al., 2016).

Коронавирус КРС (BCoV) — пневмоэнтеритный вирус вида *Betacoronavirus 1* (подрод *Embecovirus*) рода *Betacoronavirus*, к которому также относятся вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита свиней, коронавирус лошадей, HCoV-43, HECoV-44 и респираторный коронавирус собак (de Groot, Baker et al., 2012) (рис. 1, рис. 2). Ввиду высокой степени генетического и антигенного родства представители вида *Betacoronavirus 1* считаются вариантами одного родительского вируса, адаптировавшимися к различным хозяевам в ходе генетической рекомбинации и межвидовой трансмиссии (Zhang, Herbst et al., 1994; Alekseev, Vlasova et al., 2008; Lau, Lee et al., 2011; Lau, Woo et al., 2012).

Вирионы коронавирусов плеоморфные, окружены оболочкой, в диаметре достигают 65–210 нм (Clark, 1993). Вирусные частицы сформированы из пяти основных структурных белков: белка нуклеокапсида (N, 50 кДа), мембранный белка (M, 25 кДа), белка оболочки (E, 8 кДа), гемагглютинин-эстеразы (HE, 120–140 кДа) и белка шипа (S, 190 кДа) (Clark, 1993). Последний состоит из субъединиц S1, в составе которой находятся основные распознающиеся антителами эпигоптипы, и S2, которая опосредует слияние вируса с мембраной. Гемагглютинин-эстераза выступает как белок, разрушающий рецептор, для того чтобы обратить вспять процесс гемагглютинации. Белок N располагается внутри оболочки вириона и связан с вирусной РНК, белок M образует обо-

ложку вириона и экспонирован с обеих ее сторон, в то время как белки S и HE находятся с внешней стороны оболочки. Кроме того, у бетакоронавирусов идентифицированы 16 неструктурных белков (nsp1-16) (Cox, Parker et al., 1991; Gustin, Guan et al., 2009). Как и другие оболочечные вирусы, BCoVs чувствительны к детергентам и растворителям жиров (таких, как простые эфиры и хлороформ) и легко инактивируются большинством дезинфицирующих агентов, формалином и при нагревании.

Коронавирусы вызывают у КРС и других жвачных заболевания дыхательного и желудочно-кишечного трактов, однако могут быть идентифицированы в соответствующих тканях и у здоровых животных (Saif, 1990; Clark, 1993; Saif, 2010; Saif and Jung, 2020). BCoV выделяется в окружающую среду в составе фекалий и носовой слизи. Данный вирус является причиной 3 различных клинических синдромов у КРС: неонатальной диареи телят (Clark, 1993; Tsunemitsu and Saif, 1995), зимней дизентерии, при которой характерна геморрагическая диарея у взрослых животных (Saif, 1990; Tsunemitsu and Saif, 1995; Cho, Halbur et al., 2000; Traven, Naslund et al., 2001) и респираторных инфекций, рассматриваемых обычно как часть комплекса респираторных заболеваний КРС или транспортной лихорадки у животных в откормочных хозяйствах (Clark, 1993; Lathrop, Wittum et al., 2000; Saif, 2010; Ellis, 2019) (рис. 1). Комплекс респираторных заболеваний КРС является причиной значительного экономического ущерба в мясных и молочных хозяйствах по причине высокой заболеваемости и смертности. В Северной Америке данный комплекс является наиболее частой причиной гибели и патологических изменений среди телят в возрасте 6–10 месяцев после их поступления в откормочные



**Рис. 2. Филогенетический анализ полных последовательностей геномов респираторных и энтеропатогенных изолятов BCoV и подобных коронавирусов диких жвачных.**

Филогенетическое древо составлялось при помощи метода наибольшего правдоподобия и эволюционной модели GTR (General Time Reversible model). На рисунке представлено древо, построенное для максимального значения логарифмического правдоподобия ( $-81750,81$ ). Процентная доля деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются друг с другом, указана рядом с соответствующими ветвями. Древо построено в масштабе, длина ветви определялась на основе числе замен на участке.

Анализ охватывал 53 нуклеотидных последовательности. Эволюционный анализ проводили при помощи MEGA X (Kumar, Stecher et al., 2018). Черными треугольниками помечены изоляты bovine-like коронавирусов, полученных из материала от диких жвачных; черными кругами помечены респираторные изоляты BCoV. К неразвернутой ветви относится в том числе кластер изолятов BCoV, полученных недавно в Японии (Suzuki, Otake et al., 2020)

хозяйства (United States Department of Agriculture, 2000).

Все изоляты BCoV, идентифицированные к настоящему времени в фекалиях и носовой слизи животных, были отнесены к одному серотипу/генотипу

по итогам перекрестной нейтрализации и генотипирования безотносительно их происхождения (Tsunemitsu and Saif, 1995; Hasoksuz, Lathrop et al., 1999; Saif and Jung, 2020; Suzuki, Otake et al., 2020). Однако в ходе генотипирования были

идентифицированы отдельные сублинии и кластеры, деление на которые коррелировало с местом и временем получения изолята, но не с типом заболевания (Zhang, Hasoksuz et al., 2007; Alekseev, Vlasova et al., 2008; Bok, Mino et al., 2015; Gunn, Collins et al., 2015; Suzuki, Otake et al., 2020) (рис. 2). Сходным образом выделяют 2–3 подтипа BCoV в зависимости от биологических и антигенных характеристик, установленных при проведении реакций нейтрализации и методом ИФА с моноклональными антителами, однако привязки к типу заболевания также не было (Clark, 1993; Tsunemitsu and Saif 1995; Saif 2010; Saif and Jung, 2020). Несмотря на то, что в некоторых исследованиях были найдены мутации, потенциально коррелировавшие с респираторным или энтеропатогенным фенотипом (Gelinas, Boutin et al., 2001; Gelinas, Sasseville et al., 2001; Vijgen, Keyaerts et al., 2006), достаточно убедительно они подтверждены не были другими группами либо в экспериментальных исследованиях (Zhang, Hasoksuz et al., 2007). Кроме того, помимо многочисленных генетических различий (точечные мутации и делеции) в S-белке, отмеченных между респираторными и энтеропатогенными изолятами либо между BCoV и близкими к нему вирусами диких жвачных и вирусами человека, испытания *in vivo* и *in vitro* продемонстрировали высокие уровни перекрестной защиты и перекрестной нейтрализации для таких изолятов (El-Kanawati, Tsunemitsu et al., 1996; Chouljenko, Kousoulas et al., 1998; Cho, Hasoksuz et al., 2001; Hasoksuz, Sreevatsan et al., 2002; Han, Cheon et al., 2006; Hasoksuz, Alekseev et al., 2007; Zhang, Hasoksuz et al., 2007). Таким образом, не было найдено генетического или антигенного маркера, который бы коррелировал с вызываемым вирусом заболеванием, то есть развитие того или иного заболевания может быть следствием взаимодействия различных патогенов друг с

другом (коронавируса с другими вирусами и бактериями), хозяином и факторами окружающей среды.

**Эпидемиология и патогенез различных респираторных и энтеропатогенных коронавирусов КРС.** BCoV широко распространен в популяции КРС всех возрастных групп и вызывает экономические потери в мясных и молочных хозяйствах всего мира. Вирус присутствует на всех континентах, и исследования серопревалентности показали, что на протяжении своей жизни 90% животных подвергаются экспозиции вируса. BCoVs крайне часто идентифицируют в дыхательном и желудочно-кишечном тракте больных и здоровых животных (Fulton, Herd et al., 2015). Свежие данные указывают на возможность персистирования BCoV в организме не получивших молозива телят или телят, получивших молозиво, у которых наблюдались регулярные выделения из носа (Heckert, Saif et al., 1990) и достаточно высокие для обнаружения диагностическими инструментами уровни антител к BCoV, то есть иммунный ответ не всегда приводит к полной элиминации вируса (Kanno, Ishihara et al., 2018).

**Коронавирусные энтериты у КРС.** После того как коронавирус КРС был случайно открыт Мебусом и коллегами в 1972 году в Университете Небраски (Mebus, White et al., 1972), был довольно быстро получен и описан его изолят (Mebus, Stair et al., 1973), а вскоре подтвердилось, что вирус является частой причиной диареи у телят (Woode, Bridger et al., 1978). Вирус играет важную роль в развитии диареи у телят в течение первых 3 недель жизни как в мясных, так и в молочных поголовьях (Boileau and Kapil, 2010; Saif and Jung, 2020). Вирус заражает тонкий и толстый кишечник, где разрушает ворсинки, что проявляется в виде поноса в тяжелой форме, иногда кро-

вавого, смертность при этом является высокой (Mebus, Stair et al., 1973; Mebus, Newman et al., 1975; Torres-Medina, Schlafer et al., 1985). Репликация вируса поначалу протекает в различных отделах тонкого кишечника, затем этот процесс охватывает также толстый кишечник, что приводит к развитию мальабсорбтивной диареи. Зараженные BCoV клетки кишечного эпителия погибают и отслаиваются, на их место приходят незрелые эпителиоциты. Вскрытие показывает укороченные слипшиеся ворсинки, а также атрофию гаустр ободочной кишки (Mebus, Stair et al., 1973; Mebus, Newman et al., 1975; Langpap, Bergeland et al., 1979). Диарея усугубляется из-за компенсаторной гиперплазии кишечных крипт и повышенного уровня секреции жидкости (Moon, 1978). Потери зрелых кишечных эпителиоцитов, способных к всасыванию и секреции пищеварительных ферментов, значительно снижают всасывающий, метаболический и секреторный потенциал кишечника (Moon, 1978; Clark, 1993).

Непрерывное кормление часто обеспечивает животным больше питательных веществ, чем их поврежденный эпителий тонкого кишечника в состоянии усвоить (Nappert, Hamilton et al., 1993). Это в свою очередь приводит к ферментации нутриентов в толстом кишечнике, накоплению жидкости, росту бактерий и чрезмерно высокому уровню выработки органических кислот, отчего симптомы диареи становятся еще тяжелее (Moon 1978; Ewaschuk, Naylor et al., 2004). Все эти процессы приводят к обезвоживанию, ацидозу и дисбалансу электролитов из-за потери натрия, хлора, калия и гидрокарбоната (Lewis and Phillips, 1978). Несмотря на то, что эти патологические изменения и вызванные ими симптомы сильнее всего проявляются у молодых животных, BCoV также вызывает зимнюю дизентерию у взрослых молочных

коров, из-за чего значительно падает их продуктивность, а это означает серьезные экономические потери в хозяйствах (Saif, 1990; Natsuaki, Goto et al., 2007; Saif and Jung, 2020).

BCoV вызывает энтерит у животных в молочных и мясных поголовьях, причем большая часть случаев приходится на животных в возрасте до 30 дней (Mebus, White et al., 1972; Clark, 1993; Hoet, Smiley et al., 2003; Boileau and Kapil, 2010). BCoV был причиной 15–70% вспышек диареи (Marsolais, Assaf et al., 1978; Langpap, Bergeland et al., 1979; Crouch and Acres, 1984). Диарея телят может развиваться в возрасте уже 24 часов у не получивших молозива животных и самое позднее в возрасте 5 месяцев (Langpap, Bergeland et al., 1979; Reynolds, Morgan et al., 1986; Heckert, Saif et al., 1990). Вскоре после заражения телята начинают выделять в окружающую среду большие количества BCoV ( $\leq 10^9$  вирусных частиц/мл фекалий) в течение максимум 2 недель; во время же фазы выздоровления телят обычно выделяют вирус в низких концентрациях в течение нескольких недель (Kapil, Trent et al., 1990). Несмотря на то, что BCoV обнаруживается в фекалиях и больных, и здоровых телят, животные с клиническими симптомами показывали положительный результат чаще (8%–69% случаев) по сравнению со здоровыми (0%–24% случаев) (Marsolais, Assaf et al., 1978; Moon 1978; Langpap, Bergeland et al., 1979). У более чем 70% здоровых коров периодически отмечают выделение BCoV в окружающую среду, несмотря на наличие у них антител к вирусу в сыворотке крови и слизистой оболочке кишечника (Crouch and Acres, 1984; Crouch, Bielefeldt Ohmann et al., 1985). В силу того, что BCoV стабильнее при более низких температурах и пониженной интенсивности ультрафиолетового излучения, уровень его выделения в окружающую среду возрастает в зимний пери-

од на 50–60% (Collins, Riegel et al., 1987; Clark, 1993), что, вероятно, повышает вероятность развития зимней дизентерии у взрослых животных (Cho, Halbur et al., 2000). Кроме того, уровень выделения BCoV в окружающую среду возрастал на 65% во время отела и на 71% через две недели после отела, что объясняется гормональными и иммунологическими сбоями у коров в эти периоды (Collins, Riegel et al., 1987). Телята же, рожденные от коров, показывающих положительный результат при проверке на BCoV, с большей вероятностью страдают от диареи по причине контакта с контаминированной промежностью, выменем и зоной содержания коров вместе с новорожденными телятами (Bulgin, Ward et al., 1989).

Оставаясь значимым патогеном КРС, BCoV также способны пересекать межвидовые барьеры и вызывать заболевания у хозяев других видов. Например, вирус HECoV-4408, найденный у ребенка с симптомами острой диареи, очень близок к BCoV генетически, поэтому предлагалось считать его вариантом BCoV (Zhang, Herbst et al., 1994). Было продемонстрировано, что данный вирус способен заражать телят-гнотобиотов и вызывать у них диарею, а также обеспечивать полную перекрестную защиту от вирулентного BCoV-DB2 энтеропатогенного штамма CD (Han, Cheon et al., 2006). На основании данных полного анализа последовательности генома было высказано предположение, что гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней и вирус человека HCoV OC43 произошли от некоего штамма-предка BCoV (Vijgen, Keyaerts et al., 2006). Данный анализ доказывает, что коронавирусы КРС/жвачных могут становиться эндемичными у адаптивных и новых хозяев после межвидовой передачи. Энтеропатогенные коронавирусы КРС заражали собак (в экспериментальных условиях), а также разнообразных

домашних и диких жвачных животных (естественным путем и в экспериментальных условиях), вызывая инфекцию в клинической (Tsunemitsu, el-Kanawati et al., 1995) либо субклинической форме, а также сероконверсию (Kaneshima, Hohdatsu et al., 2007; Amer, 2018). Такие данные порождают вопрос, могут ли собаки и дикие жвачные служить резервуаром коронавирусам, близким к BCoV, которые могли бы передаваться КРС, или же, напротив, может ли происходить трансмиссия от КРС собакам, другим видам жвачных и человеку. В общем и целом имеющиеся данные говорят о том, что BCoVs вызывают серьезные и экономически значимые заболевания.

**Респираторные инфекции, вызываемые BCoV.** В 1982 г. Thomas et al. впервые идентифицировали BCoV как один из агентов, способствующих развитию пневмонии у телят (Thomas, Gourlay et al., 1982). Впоследствии во многих исследованиях было подтверждено, что энтеропатогенные и респираторные коронавирусы относятся к одному и тому же квазивиду (Domingo, Martinez-Salas et al., 1985), невзирая на генотипические и антигенные различия между отдельными изолятами (Saif, 2010). Начиная с 1995 г. роль респираторного коронавируса в развитии комплекса респираторных заболеваний КРС и падении продуктивности в откормочных хозяйствах признается все более широко (Lathrop, Wittum et al., 2000; Lathrop, Wittum et al., 2000; Storz, Lin et al., 2000; Storz, Purdy et al., 2000; Hasoksuz, Hoet et al., 2002; Saif, 2010; Saif and Jung, 2020). В настоящее время заболевания респираторного тракта у телят и животных в стадии откорма очень часто связывают с BCoV (Thomas, Hoet et al., 2006; Decaro, Campolo et al., 2008; Saif, 2010; Saif and Jung, 2020), причем может иметь место как респираторная инфекция в легкой форме (кашель, ринит), так и пневмония у телят в возрасте 2–6

месяцев (Saif, 2010; Saif and Jung, 2020). В одной из работ вероятность выделения BCoV в составе носовой слизи и фекалий составила 84% и 96% соответственно (Hasoksuz, Hoet et al., 2002). В другом исследовании животные проверялись за 3 дня до прибытия в откормочное хозяйство, и было установлено, что выделение вируса в составе носовой слизи начиналось раньше, чем его выделение с фекалиями (Thomas, Hoet et al., 2006). Кроме того, было продемонстрировано, что перед транспортировкой в откормочное хозяйство многие животные (61–74%) выделяли респираторный BCoV (Storz, Stine et al., 1996). От 58% до 95% животных после перевода в откормочное хозяйство становились серопозитивными по BCoV в течение 3 недель после прибытия (Martin, Nagy et al., 1998; Lathrop, Wittum et al., 2000; Cho, Hoet et al., 2001; Hasoksuz, Hoet et al., 2002). Такое широкое распространение BCoV могло бы объясняться двумя основными факторами: 1) выделением высоких титров вируса из дыхательного и пищеварительного трактов (Heckert, Saif et al., 1990; Decaro, Campolo et al., 2008) и 2) присутствием в большинстве поголовий бессимптомных носителей. Такие носители и становятся источником инфекции для новорожденных и других восприимчивых животных в хозяйстве, выделяя вирус в составе носовой слизи и фекалий (Heckert, Saif et al., 1990; Cartman and Hazlett, 1992).

Серологический скрининг, проведенный в 135 поголовьях молочных коров в Норвегии, показал, что в серопозитивных по BCoV стадах телята подвергаются большему риску развития респираторной инфекции по сравнению с серонегативными (Gulliksen, Jor et al., 2009). Телята в молочных хозяйствах Огайо выделяли респираторный BCoV с фекалиями и носовой слизью, причем у некоторых из них были отмечены симптомы диареи и/или респираторного заболе-

вания (ринит) (Heckert, Saif et al., 1990; Heckert, Saif et al., 1991). В масштабном исследовании, проведенном в откормочном хозяйстве (1074 животных), было показано, что телята, выделяющие BCoV в составе носовой слизи, с большей степенью вероятности страдали от респираторных заболеваний (в 1,6 раза) и демонстрировали очаги пневмонии при убое (в 2,2 раза) по сравнению с животными, не выделявшими BCoV (Lathrop, Wittum et al., 2000). Впоследствии было проведено еще два исследования, по итогам которых телята, выделявшие BCoV с носовой слизью, страдали от респираторных заболеваний с вероятностью, в 2,7 и 1,5 раза превышавшей таковую для животных, не выделявших вируса (Hasoksuz, Hoet et al., 2002; Thomas, Hoet et al., 2006). Кроме того, сообщалось, что выделение BCoV с носовой слизью либо титр антител <20 коррелировали с повышенной вероятностью потребности в лечении от комплекса респираторных заболеваний КРС, в то время как интраназальная иммунизация вакциной против BCoV такой риск снижала (Plummer, Rohrbach et al., 2004). В Италии в случае 3 из 4 вспышек комплекса респираторных заболеваний классические симптомы (одышка, повышение температуры тела, дыхательная недостаточность) были отмечены у телят в возрасте 2–3 месяцев, серопозитивных по BCoV и серонегативных по другим респираторным вирусным патогенам КРС, причем присутствие патогенов бактериальной природы (*Staphylococcus* spp. и *Proteus mirabilis* либо *Mannheimia haemolytica*) подтвердилось лишь в 2 из 4 вспышек (Decaro, Campolo et al., 2008).

Несмотря на обилие косвенных доказательств, полученных в ходе эпидемиологических исследований и рутинного скрининга на респираторные патогены, роль BCoV в развитии комплекса респираторных заболеваний КРС подвергалась сомнению несколько десятиле-

тий (Ellis, 2019). Связано это с тем, что попытки экспериментально воспроизвести клиническое респираторное заболевание часто бывают безуспешны (Reynolds, Debney et al., 1985; Saif, Redman et al., 1986; Cho, Hasoksuz et al., 2001; Park, Kim et al., 2007) (табл. 1). Интересно, что в ходе 1 из 4 исследований, в которых воспроизвести клинические симптомы заболевания не удалось (табл. 1), были отмечены обширные патолого-анатомические изменения в дыхательном тракте не получивших молозиво телят, зараженных штаммом KWD3 (Park, Kim et al., 2007) (табл. 1).

В ходе двух исследований некоторые признаки респираторного заболевания удалось воспроизвести с переменной степенью тяжести (табл. 1) (McNulty, Bryson et al., 1984; Kapil, Trent et al., 1990; Kapil, Pomeroy et al., 1991). В первом эксперименте 7 телят, получивших либо не получивших молозива, подвергались экспозиции супернатантом культуры органа трахеи, содержавшим BCoV (от животного, инфицированного в поле), после чего демонстрировали кашель, выделения из носа и диарею, причем у трех животных при вскрытии было обнаружено несколько удаленных друг от друга очагов ателектаза в легких (табл. 1). В другой работе три теленка, не получивших молозива, были заражены вирулентным полевым штаммом пневмоэнтеритного BCoV (Миннесота), после чего у всех проявились симптомы диареи, у двоих зарегистрировали пневмонию/тяжелое респираторное расстройство, а один из них погиб (табл. 1).

Таким образом, определенности в отношении вызываемых коронавирусом респираторных заболеваний и связанных с ними патологических изменений меньше по сравнению с энтеропатогенным BCoV (табл. 1&2) (Saif, 2010; Saif and Jung, 2020). Консенсусная точка

зрения в настоящее время такова: протекание респираторного заболевания и связанные с ним патологии могут варьироваться в зависимости от штамма, возраста животного, присутствия других патогенов (комплекс респираторных заболеваний КРС), погодных условий и дополнительных факторов стресса (табл. 2) (Saif, 2010; Saif and Jung, 2020). Перечень других вирусных и бактериальных патогенов, идентифицированных в рамках комплекса респираторных заболеваний КРС, довольно обширен и включает в себя вирус парагриппа-3, респираторно-синцитиальный вирус, аденоовирус, энтеровирус, реовирус, вирус гриппа D, вирус диареи, герпесвирусы КРС 1 и 4, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis* и *Trueperella pyogenes* (McGill and Sacco, 2020). В ряде работ оценивалось взаимодействие между респираторными патогенами и факторами стресса, причем был очевиден их синергический эффект при развитии комплекса респираторных заболеваний, но не существует таких работ, в которых рассматривался бы BCoV (Jakab, 1982; Ellis, 2019; McGill and Sacco, 2020).

В одном из недавних исследований у преждевременно отнятых телят мясной породы во время вспышки респираторного заболевания были обнаружены одновременно BCoV, *H. somni*, *M. haemolytica* и *P. multocida* (но не другие патогены, характерные для комплекса респираторных заболеваний), что указывает на существенную роль данных патогенов в развитии заболевания во время той вспышки (Workman, Kuehn et al., 2019). Мультифакторная природа комплекса респираторных заболеваний КРС делает его лечение крайне проблематичным. Так, антимикробная терапия может привести к высвобождению высоких концентраций бактериальных липополисахаридов, индуцирующих выработку

Таблица 1. Экспериментальные исследования по воспроизведению респираторного заболевания при заражении

Схема исследования	Возраст животных, дни	Число животных	Способ заражения	Антигены BCoV в дыхательном тракте/ЖКТ	Патологии в дыхательном тракте, заболевание	Патологии в ЖКТ, заболевание	Ссылка
<b>Экспериментальные исследования — отсутствие клинических признаков</b>							
Изучение перекрестной защиты у телят-гнатобиотов; материала, содержащий BCoV, имел фекальное и респираторное происхождение	1–24	9	Орально	Да (верхние дыхательные пути) / да (толстый кишечник + фекалии)	Симптомов не было	Диарея	Reynolds, Debney et al., 1985
	2–151	4	Интраназально/интратрахеально	Да (верхние дыхательные пути) / да (толстый кишечник + фекалии)	Симптомов не было	Диарея	
Заражение телят-гнатобиотов и телят, не получивших молозива, изолятом BCoV из фекалий	3–50	11	Орально, интраназально, ороназально	Да (верхние дыхательные пути) / да (фекалии)	Симптомов не было	Диарея	Saif, Redman et al., 1986
	25–63	7		Да (верхние дыхательные пути) / да (фекалии)	Симптомов не было	Диарея	
Изучение перекрестной защиты изолятов, вызывающих диарею телят, зимнюю дизентерию и респираторное заболевание, у телят-гнатобиотов и телят, не получивших молозива	1–10	6	Ороназально	Да (верхние дыхательные пути) / да (фекалии)	Симптомов не было	Диарея	Cho, Hasoksuz et al., 2001
	5–27	2	Ороназально	Да (верхние дыхательные пути) / да (фекалии)	Симптомов не было	Диарея	
Заражение телят, не получивших молозива, штаммом, вызывающим зимнюю дизентерию	2–4	8	Ороназально	Да (верхние и нижние дыхательные пути) / да (тонкий и толстый кишечник)	Повреждение эпителия носовых ходов, трахеи и легких, интерстициальная пневмония; клинических признаков не было	Атрофия ворсинок, уменьшение глубины крипт в тонком и толстом кишечнике соответственно; диарея	Park, Kim et al., 2007
<b>Экспериментальные исследования — клинические признаки</b>							
Заражение телят, получивших либо не получивших молозиво, супернатантом культуры органа трахеи, содержащим BCoV	<7	7	Интраназально/транстрахеально	Да (верхние и нижние дыхательные пути) / да (тонкий и толстый кишечник)	Несколько удаленных друг от друга очагов ателектаза, респираторное заболевание в легкой форме, кашель, выделения из носа	Диарея	McNulty, Bryson et al., 1984
Заражение телят, не получивших молозива, BCoV аттенуированного штамма и вирулентного штамма Minnesota	5	5	Орально	Да (легкие)/да (крипты / Пейеровы бляшки/фекалии)	Пневмония, дыхательная недостаточность	Диарея	Kapil, Trent et al., 1990; Kapil, Pomeroy et al., 1991

Таблица 2. Патогенез респираторной коронавирусной инфекции у КРС разных возрастных групп

	Возрастная группа		
	Молодые телята	Взрослые животные (зимняя дизентерия)	Телята в откормочных хозяйствах с респираторными заболеваниями / транспортной лихорадкой
Респираторное заболевание	Кашель, повышение температуры тела, ринит, потеря аппетита, часто на фоне диареи	Серонегативные коровы: транзиентная лихорадка, легкий кашель, серозные/слизисто-гнойные выделения	Жар, одышка, очаги воспаления и некроза в легких, ведущие к бронхопневмонии, потеря веса, гибель животных
		Серопозитивные коровы: заболевания не было	
Выделение вируса	Из респираторного и пищеварительного трактов	Серонегативные коровы: из респираторного и пищеварительного трактов	Из респираторного и пищеварительного трактов
		Серопозитивные коровы: в составе носовой слизи в ограниченных количествах	
Патологоанатомические изменения в дыхательном тракте	Иногда: повреждение эпителия носовых ходов, трахеи и легких, интерстициальная пневмония, ателектаз	—	Эксудативная или некротизирующая долевая пневмония, охватывающая 50–80% объема легких. Очаги поражения фибринозные, некротизирующая долевая пневмония на фоне бронхита и бронхиолита в диапазоне от умеренного до выраженного
Комментарий	Экспериментальное заражение (если удается воспроизвести) вызывает заболевание в более легкой форме	Заболевание обычно протекает в более легкой форме, чем у телят	Заболевание имеет многофакторную природу: часто помимо BCoV обнаруживают <i>Mannheimia hemolytica</i> и <i>Pasteurella multocida</i>

проводоспалительных цитокинов, вследствие чего усиливается поражение легких (van Reeth and Nauwynck, 2000; Saif and Jung, 2020), в то время как лечение кортикостероидами может привести к падению численности CD4 и CD8 Т-клеток и концентраций некоторых цитокинов, после чего ухудшится работа иммунной системы и симптомы станут еще тяжелее (Jung, Alekseev et al., 2007; Zhang, Alekseev et al., 2008).

Таким образом, современные данные указывают на то, что в обычных условиях заражение одним только бычьим коронавирусом не коррелирует с заметным поражением нижних дыхательных путей, но скорее всего является важным респираторным патогеном, играющим значительную роль в случае смешанной инфекции, индуцируя развитие заболевания в клинической

форме. Однако чтобы точно установить роль коронавируса в этом процессе, потребуются эксперименты с заражением серонегативных по BCoV свободных от специфических патогенов животных.

*Заболевания диких и домашних жвачных, схожие с коронавирусной инфекцией КРС.* В последние несколько десятилетий множество коронавирусов, обладающих значимым биологическим, антигенным и генотипическим сходством с BCoV, было идентифицировано в фекалиях, содержимом кишечника и выделениях из дыхательного тракта разнообразных видов домашних и диких (обитающих в неволе либо в дикой природе) жвачных — эти вирусы называют коронавирусами, схожими с коронавирусами КРС (табл. 3). Экспериментальное заражение телят-гнотобиотов или телят, не получивших мо-

лозива, показало, что многие подобные коронавирусы способны эффективно реплицироваться в тканях таких телят, вызывая у них энтерит и формирование перекрестных реакций (Tsunemitsu, el-Kanawati et al., 1995; Hasoksuz, Alekseev et al., 2007). Кроме того, 6,6; 8,7 и 13,3% образцов сыворотки от белохвостых оленей из Огайо, чернохвостых оленей из Вайоминга и оленей карибу из Квебека соответственно содержали антитела к BCoV, то есть заражение в естественных условиях происходит с той или иной регулярностью.

Полное секвенирование геномов показало, что некоторые подобные вирусы, выделенные из материала от диких и содержащихся в неволе жвачных (жирафов, замбаров, белохвостых оленей, водяных козлов, водяных оленей, саблерогих антилоп, верблюдов и азиатских буйволов), продемонстрировали высокую степень идентичности нуклеотидной последовательности (>98–99,6%) с энтеропатогенным и респираторным штаммами BCoV, подтверждая гипотезу об их близком родстве (Hasoksuz, Alekseev et al., 2007; Alekseev, Vlasova et al., 2008; Amer, 2018). Как и в случае энтеропатогенных и респираторных штаммов BCoV, не существует генетических маркеров для того, чтобы отличить друг от друга BCoV и подобные коронавирусы жвачных (Alekseev, Vlasova et al., 2008). Вместо этого филогенетический анализ выявляет кластеры, в которые попадают BCoVs/подобные коронавирусы в зависимости от года идентификации/выделения (рис. 2), что, скорее всего, говорит о параллельной эволюции соответствующих генетических пулов вируса с постоянным взаимообменом. Не было выявлено и заметных/значимых изменений генома после проведения пассажей подобных коронавирусов в

телятах-гнотобиотах. Эти данные говорят о том, что дикие жвачные могут представлять собой природный резервуар подобных коронавирусов и передавать их КРС либо наоборот; эти BCoVs представляют собой единый вид коронавирусов, для которого характерен спектр хозяев (Saif and Jung, 2020). Межвидовая трансмиссия может иметь следствием возникновение более отличных генетически, в потенциале рекомбинантных штаммов, способных уходить от иммунного ответа хозяина и, возможно, начать заражать животных других видов, в том числе человека — в прошлом такие события уже имели место (Vijgen, Keyaerts et al., 2006). Также известно, что, как и BCoVs, некоторые подобные коронавирусы из материала от диких/содержащихся в неволе жвачных способны активно реплицироваться в клетках опухоли прямой кишки человека-18 (HRT-18) cells (Tsunemitsu, el-Kanawati et al., 1995; Hasoksuz, Alekseev et al., 2007; Alekseev, Vlasova et al., 2008), что подкрепляет предположения о возможности зоонотических событий в будущем.

Интересно, что подобные коронавирусы часто выделяются из материала от диких жвачных с симптомами диареи либо здоровых, в то время как сообщений о респираторных заболеваниях, вызываемых коронавирусами у диких жвачных, не было. Это в очередной раз подтверждает многофакторную природу комплекса респираторных заболеваний у КРС, и его возникновение, вероятнее всего, связано с условиями содержания животных, такими как высокая плотность животных, транспортировка, постоянное подселение новых животных, стресс у коров, связанный с производственными условиями в хозяйствах, и т.д.

**Таблица 3. BCoV-подобные коронавирусы и виды жвачных животных, у которых были найдены антитела к ним**

Вид	Место	Тип пробы	Публикация
Азиатский буйвол	Болгария	сыворотка крови	Muniiappa, Mitov et al., 1985
Азиатский буйвол	Египет	фекалии	Abd El-Karim, El-Sanousi et al., 1990
Азиатский буйвол	Египет	фекалии	Byomi, Herbst et al., 1996
Азиатский буйвол	Египет	фекалии	Abd El-Rahim 1997
Азиатский буйвол	Италия	фекалии — содержимое кишечника	Decaro, Martella et al., 2008; Decaro, Cirone et al., 2010
Азиатский буйвол	Бангладеш	фекалии	Lau, Tsang et al., 2016
Альпака	США (Оклахома)	фекалии	Genova, Streeter et al., 2008
Альпака	Перу	фекалии	López, Chamorro et al., 2011
Альпака	Перу	смыв кишечника	Rojas, Manchego et al., 2016
Белохвостый олень	США (Огайо)	фекалии	Alekseev, Vlasova et al., 2008
Водяной козел	Великобритания	фекалии	Chasey, Reynolds et al., 1984
Водяной козел	США (Огайо)	фекалии	Tsunemitsu, el-Kanawati et al., 1995
Водяной олень	Южная Корея	мазок носовой полости	Kim, Jang et al., 2018
Гималайский тар	Южная Корея	фекалии	Chung, Kim et al., 2011
Жирафы	США (Огайо)	фекалии	Hasoksuz, Alekseev et al., 2007
Замбар	США (Огайо)	фекалии	Tsunemitsu and Saif, 1995; Alekseev, Vlasova et al., 2008
Зубр	Южная Корея	фекалии	Chung, Kim et al., 2011
Карибу/северные олени	Канада	сыворотка крови	Elazhary, Frechette et al., 1981
Козы	Южная Корея	сыворотка крови	Yang, Hwang et al., 2008
Лама, альпака	США (Орегон)	фекалии	Cebra, Mattson et al., 2003; Jin, Cebra et al., 2007
Лесной бизон	Канада	сыворотка крови	Harms, Jung et al., 2019
Ньяла	Южная Корея	фекалии	Chung, Kim et al., 2011
Овцебык	Великобритания	фекалии	Chasey, Reynolds et al., 1984
Овцы	США (Айдахо, Монтана)	фекалии	Harp, Myers et al., 1981
Овцы	Чили	содержимое кишечника	Reinhardt, Zamora et al., 1995
Овцы, козы	Испания	фекалии	Munoz, Alvarez et al., 1996
Овцы, козы	Турция	содержимое кишечника	Ozmen, Yukari et al., 2006
Овцы	Швеция	сыворотка крови	Traven, Carlsson et al., 1999
Одногорбый верблюд	США (Висконсин)	фекалии	Wunschmann, Frank et al., 2002

продолжение таблицы

Вид	Место	Тип пробы	Публикация
Одногорбый верблюд	ОАЭ (Дубай)	фекалии	Woo, Lau et al., 2014; Woo, Lau et al., 2016
Одногорбый верблюд	Саудовская Аравия	мазок — ректальный или носовой полости	Sabir, Lam et al., 2016
Олень вапити	Канада	фекалии	Smits 1991
Олень вапити	США (Канзас)	фекалии	Majhdi, Minocha et al., 1997
Пятнистый олень	Япония	сыворотка крови	Yokoi, Okazaki et al., 2009
Саблерогие антилопы	США (Огайо)	фекалии	Alekseev, Vlasova et al., 2008
Ситатунга	Великобритания	фекалии	Chasey, Reynolds et al., 1984
Ситатунга	Южная Корея	фекалии	Chung, Kim et al., 2011
Як	Китай	фекалии	He, Guo et al., 2019

**Диагностика.** Пневмоэнтеритные BCoVs реплицируются в тканях верхних дыхательных путей и пищеварительном тракте; они обнаруживаются в носовой слизи и фекалиях, причем выделение в составе носовой слизи предшествует выделению с фекалиями (Reynolds, Debney et al., 1985; Saif, Redman et al., 1986; Cho, Hoet et al., 2001; Hasoksuz, Hoet et al., 2002; Oma, Traven et al., 2016; Saif and Jung, 2020). BCoV также был обнаружен либо выделен из легочной ткани животных с симптомами респираторного заболевания (Storz, Lin et al., 2000). При вскрытии животных с подозрением на коронавирусную инфекцию (респираторную или кишечную) получают образцы тканей дыхательного тракта (например тканей носовой полости, гортани, трахеи и легких) (Storz, Stine et al., 1996; Hasoksuz, Lathrop et al., 1999; Storz, Purdy et al., 2000) и образцы из дистальных отделов тонкого либо толстого кишечника (Saif, Redman et al., 1986). При жизни животных мазки носовой слизи получают при помощи полиэстеровых зонд-тампонов, а образцы фекалий собирают в стерильные емкости, которые оперативно охлаждают и транспортируют в ди-

агностическую лабораторию (Hasoksuz, Lathrop et al., 1999; Cho, Hoet et al., 2001). У телят с симптомами респираторного заболевания в острой форме возможна аспирация трахеобронхиальных смывов, если в прошлом животные показали положительный результат при проверке на антиген BCoV методом ИФА (Uttenthal, Jensen et al., 1996).

Транзиентная природа острых кишечных инфекций, вызываемых BCoV у молодых телят и серонегативных животных, требует отбора проб в момент манифестации заболевания или вскоре после. Однако сообщалось и о персистентном выделении вируса у выздоравливших животных, и о выделении вируса с перерывами у здоровых (Heckert, Saif et al., 1990; Gomez, Arroyo et al., 2017; Kanno, Ishihara et al., 2018). В связи со стрессом, вызванным транспортировкой и совместным содержанием животных с разных ферм, пик уровня выделения BCoV с носовой слизью или фекалиями, коррелирующего с комплексом респираторных заболеваний КРС, наблюдается 1–2 недели спустя после прибытия в откормочное хозяйство (Storz, Purdy et al., 2000; Cho, Hoet

et al., 2001; Hasoksuz, Hoet et al., 2002; Thomas, Hoet et al., 2006).

Диагностировать заражение BCoV можно путем обнаружения вируса, вирусных антигенов или вирусной РНК в тканях или различных выделениях животных. Комплексный подход к диагностике заключается в детекции вируса в носовой слизи, а также выделении вируса в культуре клеток HRT-18 во время острой фазы и/или в обнаружении антител, связывающихся с BCoV, либо вируснейтрализующих антител в период выздоровления (Storz, Stine et al., 1996; Hasoksuz, Lathrop et al., 1999; Storz, Purdy et al., 2000; Hasoksuz, Vlasova et al., 2008; Saif and Jung, 2020).

Возможно также проведение иммунофлуоресцентного/иммуногистохимического мечения гипериммунной антисывороткой или моноклональными антителами к BCoV в замороженных или залитых в парафин тканях дыхательного (трахея, легкие) или пищеварительного тракта (подвздошная кишка, толстый кишечник). Кроме того, визуализировать BCoV в носовой слизи или фекалиях можно при помощи электронной микроскопии, позволяющей обнаружить также другие вирусы, но чувствительность данного метода сравнительно невысока (Heckert, Saif et al., 1990; Tsunemitsu, el-Kanawati et al., 1995). Антигены BCoV чаще всего обнаружаются методом ИФА на основе моноклональных антител — такие наборы могут использоваться для быстрой и надежной проверки большого числа проб. Наибольшей чувствительностью обнаружения BCoV обладают наборы для диагностики методом ПЦР с обратной транскрипцией, вложенной ПЦР с обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени; для амплификации используется один из наиболее консервативных участков вирусного генома — открытая рамка считывания ORF1ab либо ген белка нуклеокап-

сида (Cho, Hasoksuz et al., 2001; Decaro, Elia et al., 2008; Gomez, Arroyo et al., 2017). В случае проб фекалий может потребоваться дополнительный контроль или разведение проб, чтобы избежать вмешательства в протекание ПЦР ингибиторов реакции (Acharya, Dhand et al., 2017).

Количественно оценить уровень антител к BCoV в сыворотке крови, носовой слизи или фекалиях можно с помощью ИФА (как общего, так и изотип-специфичного (IgM, IgA, IgG1, IgG2)) либо реакции нейтрализации или реакции торможения гемагглютинации (РТГА), позволяющих измерить уровень вируснейтрализующих или антигемагглютинирующих антител соответственно (Heckert, Saif et al., 1991; Hasoksuz, Lathrop et al., 1999; Lin, O'Reilly et al., 2001). Так как антитела к BCoV встречаются у КРС очень часто, нужны парные пробы, полученные во время острой фазы и выздоровления для того, чтобы серологическая диагностика была надежной (Saif, 2010).

**Иммунитет, вакцинация и другие стратегии профилактики.** Какие показатели коррелируют с обеспечением защиты от BCoV, все еще не удалось в точности установить. В ряде исследований уровень антител, связывающих вирус, вируснейтрализующих либо антигемагглютинирующих, в сыворотке крови инфицированных в естественных условиях телят либо животных, прибывших в откормочное хозяйство, коррелировал с уровнем защиты от кишечных и респираторных инфекций (включая пневмонию), а также от выделения вируса во внешнюю среду (Heckert, Saif et al., 1991; Martin, Nagy et al., 1998; Cho, Hoet et al., 2001; Lin, O'Reilly et al., 2001; Lin, O'Reilly et al., 2002; Thomas, Hoet et al., 2006; Bok, Alassia et al., 2018; Saif and Jung, 2020). Инокуляция телят-гнотобиотов или телят, не получивших молозива, бычым коронавирусом штаммов, вызывающих

диарею телят, зимнюю дизентерию или респираторные расстройства, обеспечивала полноценную защиту от диареи при последующем контролльном заражении вирулентным штаммом, вызывающим диарею телят (El-Kanawati, Tsunemitsu et al., 1996; Cho, Hasoksuz et al., 2001). Однако не до конца понятно, обеспечивают ли защиту от BCoV антитела в сыворотке крови или же просто отражают факт экспозиции вируса в прошлом, и потребуются дальнейшие исследования, чтобы это прояснить. Есть некоторые данные эпидемиологических исследований, согласно которым присутствие антител в сыворотке крови в достаточно высоких титрах может быть маркером защищенности от респираторных заболеваний (Saif, 2010). Точно так же Lin et al. продемонстрировали, что у животных, выделявших BCoV в начале эпизоотии комплекса респираторных заболеваний/пневмонии, уровни вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител были низкими, в то время как в пробах материала от животных с высокими концентрациями антител к гемагглютининэстеразе и гликопротеину S BCoV обнаружен не был (Lin, O'Reilly et al., 2001; Lin, O'Reilly et al., 2002). Кроме того, титры вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител, а также уровни IgM, IgG1 и IgG2 к BCoV в сыворотке крови в значительной степени коррелировали с уровнем защиты от респираторной инфекции, вызываемой BCoV. Также у животных, страдавших от респираторной коронавирусной инфекции с последующим летальным исходом, были обнаружены только антитела класса IgM. Однако недавнее долгосрочное исследование показало, что уровни антител к BCoV в сыворотке крови не коррелировали с заболеваемостью для комплекса респираторных заболеваний КРС или выделением во внешнюю среду BCoV (Workman, Kuehn et al., 2019).

Оптимальные вакцины против пневмо-энтеропатогенов, поражающих слизистые оболочки, должны доставляться и быть эффективными в обоих сайтах репликации вируса (дыхательном и желудочно-кишечном трактах) для обеспечения оптимального качества защиты. Кроме того, большинство вакцин против патогенов, активных в слизистых оболочках, не в состоянии индуцировать стерильный иммунитет или предотвратить повторное заражение, что было отмечено при наблюдении за животными, инфицированными BCoV естественным путем или экспериментально (Heckert, Saif et al., 1990; Cho, Hasoksuz et al., 2001). Таким образом, целью вакцинации является обеспечение защиты от кишечных и респираторных инфекций в тяжелой форме, которые могут повлечь за собой гибель животного и требуют лечения. Достичь этих целей можно, если вакцинировать телят в хозяйствах перед транспортировкой на аукционы или в откормочные хозяйства, так как в последних присутствует BCoV и необходимо наличие иммунитета. В подтверждение этой гипотезы в одной из недавних работ было продемонстрировано, что интраназальная вакцинация телят живой модифицированной вакциной в момент прибытия на откорм значительно снижала риски развития комплекса респираторных заболеваний КРС (Plummer, Rohrbach et al., 2004). Эти данные согласуются с результатами экспериментального заражения телят, подтверждающих существование перекрестной защиты между штаммами BCoV различного клинического происхождения. В другом недавнем исследовании, проведенном в Уругвае, вакцинация коров против BCoV позволяла снизить уровень выделения BCoV во внешнюю среду их потомством (Castells, Giannitti et al., 2019). Чтобы установить, является ли оптимальной стратегией обеспечения защиты широкого спектра использова-

ние смеси штаммов BCoV, вызывающих диарею телят/зимнюю дизентерию/респираторные заболевания, потребуются дальнейшие исследования (Saif, 2010).

В настоящее время лицензирован ряд живых модифицированных вакцин против BCoV (Bovilis, Merck/PBS Animal Health; Guardian, Merck; Calf-Guard, ScourGuard 4KC и BoviShield Gold 5, Zoetis; CattleWin BC, KyotoBiken Laboratories, Kyoto, Japan), однако данные наблюдений или полевых испытаний, позволяющие оценить их защитный потенциал против диареи телят/зимней дизентерии, остаются скучными, в то время как некоторые исследования указывают на слабую защиту от комплекса респираторных заболеваний (Fulton, d'Offay et al., 2016). Большинство исследователей, оценивавших вакцины-кандидаты против BCoV, отмечают их безопасность и иммуногенность, но не эффективность в том, что касается защиты (Welter, 1998; Takamura, Matsumoto et al., 2002; Decaro, Campolo et al., 2009; Jee, Hoet et al., 2013).

Повсеместная распространённость коронавирусных инфекций КРС, отсутствие всесторонних исследований эффективности вакцин против них, невысокая продолжительность иммунитета слизистых оболочек после вакцинации, иммунологическая незрелость телят и возможное вмешательство материнских антител — это лишь некоторые из препятствий, стоящих на пути получения оптимальных профилактических инструментов для защиты от респираторных и кишечных инфекций, вызываемых BCoV. Кроме того, сложности в области менеджмента, связанные с вакцинацией (необходимость отслеживать различные возрастные группы, производственный статус, свежеприбывших животных и др.) и нерациональное соотношение издержек и выгод вакцинации указывают на необходимость

оценки и внедрения альтернативных инструментов профилактики и борьбы с коронавирусной инфекцией. Пока единственной страной, внедрившей комплексную программу биобезопасности и борьбы с комплексом респираторных заболеваний КРС, является Норвегия (Stokstad, Klem et al., 2020). В рамках этой программы ставится цель снизить распространённость BCoV в поголовьях за счет внедрения строгих мер биобезопасности и системы вознаграждения для фермеров и других игроков отрасли, но вакцинация не предполагается. Эффективность этого подхода пока только предстоит оценить.

## Заключительные замечания

Имеющихся на сегодняшний день данных по-прежнему недостаточно, и потребуются дополнительные исследования, чтобы прийти к пониманию основных механизмов патогенеза при кишечных и респираторных инфекциях, вызываемых BCoV, а также взаимодействий между вирусом, хозяином и факторами окружающей среды, которые могут усугубить тяжесть заболевания или спровоцировать более высокий уровень выделения вируса и его трансмиссии. Необходимы масштабные исследования, чтобы установить корреляты иммунной защиты и инструменты для получения эффективных вакцин/схем иммунизации, которые позволят ограничить распространение вируса. Требуют внимания и механизмы, определяющие межвидовую трансмиссию для BCoV и формирование круга его хозяев. Кроме того, нужны наблюдения в реальном времени за экологией подобных коронавирусов в популяциях диких животных (диких жвачных и других восприимчивых видов), а также оценка факторов риска, который они представляют для здоровья населения и животных.

## Литература

1. Abd El-Karim I.A., El-Sanousi A.A., Aly N.M., Reda I.M. Detection of coronavirus antigen in fecal samples obtained from newborn buffalo calves. *Veterinary Medical Journal Giza.* 1990; 38: 77–85.
2. Abd El-Rahim I.H.A. Rota and/or coronavirus infections in newborn buffalo calves in Upper Egypt. Proceedings of the 4th Scientific Congress. Egyptian Society for Cattle Diseases Assuit. Egypt. 1997; 210–220.
3. Acharya K.R., Dhand N.K., Whittington R.J., Plain K.M. PCR Inhibition of a Quantitative PCR for Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* DNA in Feces: Diagnostic Implications and Potential Solutions. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 115.
4. Akimkin V., Beer M., Blome S., Hanke D., Hoper D., Jenckel M., Pohlmann A. New Chimeric Porcine Coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1314–1315.
5. Alekseev K.P., Vlasova A.N., Jung K., Hasoksuz M., Zhang X., Halpin R., Wang S., Ghedin E., Spiro D., Saif L.J. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J. Virol.* 2008; 82(24): 12422–12431.
6. Amer H.M. Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants.» *Anim. Health. Res. Rev.* 2018; 19(2): 113–124.
7. Boileau M.J., Kapil S. Bovine coronavirus associated syndromes. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 123–146, table of contents.
8. Bok M., Alassia M., Frank F., Vega C.G., Wigdorovitz A., Parreno V. Passive immunity to control Bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2018; 50(1): 23–30.
9. Bok M., Mino S., Rodriguez D., Badaracco A., Nunes I., Souza S.P., Bilbao G., Louge Uriarte E., Galarza R., Vega C., Odeon A., Saif L.J., Parreno V. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010.» *Vet. Microbiol.* 2015; 181(3–4): 221–229.
10. Boniotti M.B., Papetti A., Lavazza A., Alborali G., Sozzi E., Chiapponi C., Facchini S., Bonilauri P., Cordioli P., Marthaler D. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(1): 83–87.
11. Bulgin M.S., Ward A.C., Barrett D.P., Lane V.M. Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herds in Idaho. *Can. Vet. J.* 1989; 30(3): 235–239.
12. Byomi A., Herbst W., Baljer G. Some viral agents associated with neonatal calf diarrhea. *Assuit Veterinary Medical Journal.* 1996; 35: 1–9.
13. Carman P.S., Hazlett M.J. Bovine coronavirus infection in Ontario 1990–1991. *Can. Vet. J.* 1992; 33(12): 812–814.
14. Castells M., Giannitti F., Caffarena R.D., Casaux M.L., Schild C., Castells D., Riet-Correa F., Victoria M., Parreno V., Colina R. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2715–2724.
15. Cebra, C.K., Mattson D.E., Baker R.J., Sonn R.J., Dearing P.L. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea» *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003; 223(12): 1806–1808.
16. Chasey D., Reynolds D.J., Bridger J.C., Debney T.G., Scott A.C. Identification of coronaviruses in exotic species of Bovidae. *Vet. Rec.* 1984; 115(23): 602–603.
17. Cho K.O., Halbur P.G., Bruna J.D., Sorden S.D., Yoon K.J., Janke B.H., Chang K.O. and Saif L.J. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000; 217(8): 1191–1194.

18. Cho K.O., Hasoksuz M., Nielsen P.R., Chang K.O., Lathrop S. and Saif L.J. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* 2001; 146(12): 2401–2419.
19. Cho K.O., Hoet A.E., Loerch S.C., Wittum T.E. and Saif L.J. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.* 2001; 62(9): 1436–1441.
20. Chouljenko V.N., Kousoulas K.G., Lin X. and Storz J. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes.* 1998; 17(1): 33–42.
21. Chung J.Y., Kim H.R., Bae Y.C., Lee O.S. and Oem J.K. Detection and characterization of bovine-like coronaviruses from four species of zoo ruminants. *Vet. Microbiol.* 2011; 148(2–4): 396–401.
22. Clark M.A. Bovine coronavirus. *Br. Vet. J.* 1993; 149(1): 51–70.
23. Collins J.K., Riegel C.A., Olson J.D. and Fountain A. Shedding of enteric coronavirus in adult cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1987; 48(3): 361–365.
24. Cox G.J., Parker M.D. and Babiuk L.A. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. *Virology.* 1991; 185(1): 509–512.
25. Crouch C.F. and Acres S.D. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the feces of normal cows. *Can. J. Comp. Med.* 1984; 48(3): 340–342.
26. Crouch C.F., Bielefeldt Ohmann H., Watts T.C. and Babiuk L.A. Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. *J. Gen. Virol.* 1985; 66(7): 1489–1500.
27. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbatenya A.E., Holmes K.V., Perlman S., Poon L., Rottier P.J.M., Talbot P.J., Woo P.C.Y. and Ziebuhr J. Family Coronaviridae Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. A.M.Q. King, M. Adams, E. Carstens and E. Lefkowitz. San Diego, Elsevier Science Publishing Co., Inc.: 2012; 8.6–828.
28. Decaro N., Campolo M., Desario C., Cirone F., D'Abramo M., Lorusso E., Greco G., Mari V., Colaianni M.L., Elia G., Martella V. and Buonavoglia C. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(1): 28–32.
29. Decaro N., Campolo M., Mari V., Desario C., Colaianni M.L., Di Trani L., Cordioli P. and Buonavoglia C. A candidate modified-live bovine coronavirus vaccine: safety and immunogenicity evaluation. *New Microbiol.* 2009; 32(1): 109–113.
30. Decaro N., Cirone F., Mari V., Nava D., Tinelli A., Elia G., Di Sarno A., Martella V., Colaianni M.L., Aprea G., Tempesta M. and Buonavoglia C. Characterisation of bubaline coronavirus strains associated with gastroenteritis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Vet. Microbiol.* 2010; 145(3–4): 245–251.
31. Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Mari V., Radogna A., Colaianni M.L., Cirone F., Tempesta M. and Buonavoglia C. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2008; 151(2): 167–171.
32. Decaro N., Mari V., Elia G., Addie D.D., Camero M., Lucente M.S., Martella V. and Buonavoglia C. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(1): 41–47.
33. Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M., Mari V., Desario C., Lucente M.S., Lorusso A., Greco G., Corrente M., Tempesta M. and Buonavoglia C. Biological and genetic analysis of a bovine-like coronavirus isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Virology.* 2008; 370(1): 213–222.

34. Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortín J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R. and et al. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene*. 1985; 40(1): 1–8.
35. Drake J.W. and Holland J.J. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(24): 13910–13913.
36. Drosten C., Muth D., Corman V.M., Hussain R., Al Masri M., HajOmar W., Landt O., Assiri A., Eckerle I., Al Shangiti A., Al-Tawfiq J.A., Albarak A., Zumla A., Rambaut A. and Memish Z.A. An observational, laboratory-based study of outbreaks of middle East respiratory syndrome coronavirus in Jeddah and Riyadh, kingdom of Saudi Arabia, 2014. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60(3): 369–377.
37. El-Kanawati Z.R., Tsunemitsu H., Smith D.R. and Saif L.J. Infection and cross-protection studies of winter dysentery and calf diarrhea bovine coronavirus strains in colostrum-deprived and gnotobiotic calves. *Am. J. Vet. Res.* 1996; 57(1): 48–53.
38. Elazhar, M.A., Frechette J.L., Silim A. and Roy R.S. Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in Quebec. *J. Wildl. Dis.* 1981; 17(4): 609–612.
39. Ellis J. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? *Can. Vet. J.* 2019; 60(2): 147–152.
40. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Palmer R., Whiting S.J. and Zello G.A. D-lactate production and excretion in diarrheic calves. *J. Vet. Intern. Med.* 2004; 18(5): 744–747.
41. Fulton R.W., d'Offay J.M., Landis C., Miles D.G., Smith R.A., Saliki J.T., Ridpath J.F., Confer A.W., Neill J.D., Eberle R., Clement T.J., Chase C.C., Burge L.J. and Payton M.E. Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine*. 2016; 34(30): 3478–3492.
42. Fulton R.W., Herd H.R., Sorensen N.J., Confer A.W., Ritchev J.W., Ridpath J.F. and Burge L.J. Enteric disease in post-weaned beef calves associated with Bovine coronavirus clade 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2015; 27(1): 97–101.
43. Gelinas A.M., Boutin M., Saserville A.M. and Dea S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. *Virus Res.* 2001; 76(1): 43–57.
44. Gelinas A.M., Saserville A.M. and Dea S. Identification of specific variations within the HE, S1, and ORF4 genes of bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in dairy cattle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 494: 63–67.
45. Genova S.G., Streeter R.N., Simpson K.M. and Kapil S. Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15(10): 1629–1632.
46. Gomez D.E., Arroyo L.G., Poljak Z., Viel L. and Weese J.S. Detection of Bovine Coronavirus in Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *J. Vet. Intern. Med.* 2017; 31(6): 1884–1891.
47. Gulliksen S.M., Jor E., Lie K.I., Loken T., Akerstedt J. and Osteras O. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(10): 5139–5146.
48. Gunn L., Collins P.J., O'Connell M.J. and O'Shea H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Ir. Vet. J.* 2015; 68: 31.
49. Gustin K.M., Guan B.J., Dziduszko A. and Brian D.A. Bovine coronavirus non-structural protein 1 (p28) is an RNA binding protein that binds terminal genomic cis-replication elements. *J. Virol.* 2009; 83(12): 6087–6097.
50. Han M.G., Cheon D.S., Zhang X. and Saif L.J. Cross-protection against a human

- enteric coronavirus and a virulent bovine enteric coronavirus in gnotobiotic calves. *J. Virol.* 2006; 80(24): 12350–12356.
51. Harms N.J., Jung T.S., Andrew C.L., Surujballi O.P., VanderKop M., Savic M. and Powell T. Health status of reintroduced wood bison (*Bison Bison Athabascae*): assessing the conservation value of an isolated population in Northwestern Canada. *J. Wildl. Dis.* 2019; 55(1): 44–53.
  52. Harp J.A., Myers L.L., Rich J.E. and Gates N.L. Role of *Salmonella arizonaee* and other infective agents in enteric disease of lambs. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 42(4): 596–599.
  53. Hasoksuz M., Alekseev K., Vlasova A., Zhang X., Spiro D., Halpin R., Wang S., Ghedin E. and Saif L.J. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *J. Virol.* 2007; 81(10): 4981–4990.
  54. Hasoksuz M., Hoet A.E., Loerch S.C., Wittum T.E., Nielsen P.R. and Saif L.J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002; 14(4): 308–313.
  55. Hasoksuz M., Lathrop S., Al-dubaib M.A., Lewis P. and Saif L.J. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 1999; 144(12): 2441–2447.
  56. Hasoksuz M., Lathrop S.L., Gadfield K.L. and Saif L.J. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. *Am. J. Vet. Res.* 1999; 60(10): 1227–1233.
  57. Hasoksuz M., Sreevatsan S., Cho K.O., Hoet A.E. and Saif L.J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus. Res.* 2002; 84(1–2): 101–109.
  58. Hasoksuz M., A. Vlasova and L.J. Saif. Detection of group 2a coronaviruses with emphasis on bovine and wild ruminant strains. Virus isolation and detection of antibody, antigen, and nucleic acid. *Methods. Mol. Biol.* 2008; 454: 43–59.
  59. He Q., Z. Guo, B. Zhang, H. Yue and C. Tang. First detection of bovine coronavirus in Yak (*Bos grunniens*) and a bovine coronavirus genome with a recombinant HE gene. *J. Gen. Virol.* 2019; 100(5): 793–803.
  60. Heckert R.A., L.J. Saif, K.H. Hoblet and A.G. Agnes. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet. Microbiol.* 1990; 22(2–3): 187–201.
  61. Heckert R.A., L.J. Saif, J.P. Mengel and G.W. Myers. Mucosal and systemic antibody responses to bovine coronavirus structural proteins in experimentally challenge-exposed calves fed low or high amounts of colostral antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52(5): 700–708.
  62. Heckert R.A., L.J. Saif, G.W. Myers and A.G. Agnes. Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52(6): 845–851.
  63. Hoet A.E., J. Smiley, C. Thomas, P.R. Nielsen, T.E. Wittum and L.J. Saif. Association of enteric shedding of bovine torovirus (Breda virus) and other enteropathogens with diarrhea in veal calves. *Am. J. Vet. Res.* 2003; 64(4): 485–490.
  64. Huynh J., S. Li, B. Yount, A. Smith, L. Sturges, J.C. Olsen, J. Nagel, J.B. Johnson, S. Agnihothram, J.E. Gates, M.B. Frieman, R.S. Baric and E.F. Donaldson. Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. *J. Virol.* 2012; 86(23): 12816–12825.
  65. Jakab G.J. Viral-bacterial interactions in pulmonary infection. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 1982; 26: 155–171.
  66. Jee J., A.E. Hoet, M.P. Azevedo, A.N. Vlasova, S.C. Loerch, C.L. Pickworth, J. Hanson and L.J. Saif. Effects of dietary

- vitamin A content on antibody responses of feedlot calves inoculated intramuscularly with an inactivated bovine coronavirus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 2013; 74(10): 1353–1362.
67. Jin L., C.K. Cebra, R.J. Baker, D.E. Mattson, S.A. Cohen, D.E. Alvarado and G.F. Rohrmann. Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. *Virology*. 2007; 365(1): 198–203.
68. Jung K., K.P. Alekseev, X. Zhang, D.S. Cheon, A.N. Vlasova and L.J. Saif. Altered pathogenesis of porcine respiratory coronavirus in pigs due to immunosuppressive effects of dexamethasone: implications for corticosteroid use in treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2007; 81(24): 13681–13693.
69. Kaneshima T., T. Hohdatsu, R. Hagi no, S. Hosoya, Y. Nojiri, M. Murata, T. Takano, M. Tanabe, H. Tsunemitsu and H. Koyama. The infectivity and pathogenicity of a group 2 bovine coronavirus in pups. *J. Vet. Med. Sci.* 2007; 69(3): 301–303.
70. Kanno T., R. Ishihara, S. Hatama and I. Uchida. A long-term animal experiment indicating persistent infection of bovine coronavirus in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2018; 80(7): 1134–1137.
71. Kapil S., K.A. Pomeroy, S.M. Goyal and A.M. Trent. Experimental infection with a virulent pneumoenteric isolate of bovine coronavirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1991; 3(1): 88–89.
72. Kapil S., A.M. Trent and S.M. Goyal. Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Arch. Virol.* 1990; 115(1–2): 127–132.
73. Kim J. H., J.H. Jang, S.W. Yoon, J.Y. Noh, M.J. Ahn, Y. Kim, D.G. Jeong and H.K. Kim. Detection of bovine coronavirus in nasal swab of non-captive wild water deer, Korea. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65(3): 627–631.
74. Ksiazek T.G., D. Erdman, C.S. Goldsmith, S.R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J.A. Comer, W. Lim, P.E. Rollin, S.F. Dowell, A.E. Ling, C. D. Humphrey, W.J. Shieh, J. Guarner, C.D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J.Y. Yang, N. Cox, J.M. Hughes, J.W. LeDuc, W.J. Bellini, L.J. Anderson and S.W. Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1953–1966.
75. Kumar S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–1549.
76. Langpap T.J., M.E. Bergeland and D.E. Reed. Coronaviral enteritis of young calves: virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am. J. Vet. Res.* 1979; 40(10): 1476–1478.
77. Lathrop S.L., T.E. Wittum, K.V. Brock, S.C. Loerch, L.J. Perino, H.R. Birmingham, F.T. McCollum and L.J. Saif. Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and growth performance of cattle in feedlots. *Am. J. Vet. Res.* 2000; 61(9): 1062–1066.
78. Lathrop S.L., T.E. Wittum, S.C. Loerch, L.J. Perino and L.J. Saif. Antibody titers against bovine coronavirus and shedding of the virus via the respiratory tract in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.* 2000; 61(9): 1057–1061.
79. Lau S. K., P. Lee, A.K. Tsang, C.C. Yip, H. Tse, R.A. Lee, L.Y. So, Y.L. Lau, K.H. Chan, P.C. Woo and K.Y. Yuen. Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination. *J. Virol.* 2011; 85(21): 11325–11337.
80. Lau S.K., A.K. Tsang, S. Shakeel Ahmed, M. Mahbub Alam, Z. Ahmed, P.C. Wong, K.Y. Yuen and P.C. Woo. First genome sequences of buffalo coronavirus from water buffaloes in Bangladesh. *New Microbes New Infect.* 2016; 11: 54–56.
81. Lau S.K., P.C. Woo, C.C. Yip, R.Y. Fan, Y. Huang, M. Wang, R. Guo, C.S.

- Lam, A.K. Tsang, K.K. Lai, K.H. Chan, X.Y. Che, B.J. Zheng and K.Y. Yuen. Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A coronavirus, rabbit coronavirus HKU14, from domestic rabbits. *J. Virol.* 2012; 86(10): 5481–5496.
82. Lauber C., J.J. Goeman, C. Parquet Mdel, P.T. Nga, E.J. Snijder, K. Morita and A.E. Gorbalyena. The footprint of genome architecture in the largest genome expansion in RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2013; 9(7): e1003500.
83. Lewis L.D. and R.W. Phillips. Pathophysiological changes due to coronavirus-induced diarrhea in the calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978; 173(5 Pt 2): 636–642.
84. Lin X., K.L. O'Reilly, M.L. Burrell and J. Storz. Infectivity-neutralizing and hemagglutinin-inhibiting antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle in pathogenesis of shipping fever pneumonia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8(2): 357–362.
85. Lin X.Q., K.L. O'Reilly and J. Storz. Antibody responses of cattle with respiratory coronavirus infections during pathogenesis of shipping fever pneumonia are lower with antigens of enteric strains than with those of a respiratory strain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9(5): 1010–1013.
86. López W.P., M.L. Chamorro and A.E.B. Garmendia. Rapid detection of rotavirus and coronavirus in alpaca crias (*Vicugna pacos*) with diarrhea in the Cusco region, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 2011; 22: 407–411.
87. Majhdi F., H.C. Minocha and S. Kapil. Isolation and characterization of a coronavirus from elk calves with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2937–2942.
88. Mandelik R., M. Sarvas, A. Jackova, S. Salamunova, J. Novotny and S. Vilcek. First outbreak with chimeric swine enteric coronavirus (SeCoV) on pig farms in Slovakia — lessons to learn. *Acta. Vet. Hung.* 2018; 66(3): 488–492.
89. Marsolais G., R. Assaf, C. Montpetit and P. Marois. Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* 1978; 42(2): 168–171.
90. Martin S.W., E. Nagy, P.E. Shewen and R.J. Harland. The association of titers to bovine coronavirus with treatment for bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.* 1998; 62(4): 257–261.
91. McGill J.L. and R.E. Sacco. The Immunology of Bovine Respiratory Disease: Recent Advancements. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2020; 36(2): 333–348.
92. McNulty, M.S., D.G. Bryson, G.M. Allan and E.F. Logan. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 1984; 9(5): 425–434.
93. Mebus C.A., L.E. Newman and E.L. Stair, Jr. Scanning electron, light, and immunofluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* 1975; 36(12): 1719–1725.
94. Mebus C.A., E.L. Stair, M.B. Rhodes and M.J. Twiehaus. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34(2): 145–150.
95. Mebus C.A., E.L. Stair, M.B. Rhodes and M.J. Twiehaus. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet. Pathol.* 1973; 10(1): 45–64.
96. Mebus C.A., R.G. White, E.L. Stair, M.B. Rhodes and M.J. Twiehaus. Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 1972; 67(2): 173–174 passim.
97. Moon H.W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978; 172(4): 443–448.
98. Munijiappa L., B.K. Mitov and E. Kharalambiev Kh. Demonstration of coronavirus infection in buffaloes. *Vet. Med. Nauki.* 1985; 22(8): 27–32.
99. Munoz M., M. Alvarez, I. Lanza and P. Carmenes. Role of enteric pathogens in

- the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect.* 1996; 117(1): 203–211.
100. Nappert G., D. Hamilton, L. Petrie and J.M. Naylor. Determination of lactose and xylose malabsorption in preruminant diarrheic calves. *Can. J. Vet. Res.* 1993; 57(3): 152–158.
  101. Natsuaki S., K. Goto, K. Nakamura, M. Yamada, H. Ueo, T. Komori, H. Shirakawa and Y. Uchinuno. Fatal winter dysentery with severe anemia in an adult cow. *J. Vet. Med. Sci.* 2007; 69(9): 957–960.
  102. Oma V.S., M. Traven, S. Alenius, M. Myrmel and M. Stokstad. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virol. J.* 2016; 13: 100.
  103. Ozmen O., B.A. Yukari, M. Haligur and S. Sahinduran. Observations and immunohistochemical detection of Coronavirus, Cryptosporidium parvum and Giardia intestinalis in neonatal diarrhoea in lambs and kids. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2006; 148(7): 357–364.
  104. Park S.J., G.Y. Kim, H.E. Choy, Y.J. Hong, L.J. Saif, J.H. Jeong, S.I. Park, H.H. Kim, S.K. Kim, S.S. Shin, M.I. Kang and K.O. Cho. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch. Virol.* 2007; 152(10): 1885–1900.
  105. Plummer P.J., B.W. Rohrbach, R.A. Daugherty, R.A. Daugherty, K.V. Thomas, R.P. Wilkes, F.E. Duggan and M.A. Kennedy. Effect of intranasal vaccination against bovine enteric coronavirus on the occurrence of respiratory tract disease in a commercial backgrounding feedlot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004; 225(5): 726–731.
  106. Ralph R., J. Lew, T. Zeng, M. Francis, B. Xue, M. Roux, A. Toloue Ostadgavahi, S. Rubino, N.J. Dawe, M.N. Al-Ahdal, D.J. Kelvin, C.D. Richardson, J. Kindrachuk, D. Falzarano and A.A. Kelvin. 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2020; 14(1): 3–17.
  107. Reinhardt G., J. Zamora, N. Tadich, M. Polette, M. Aguilar, S. Riedemann and J. Palisson. Diagnosis of coronavirus in sheep in Valdivia province, Xth Region, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria.* 1995; 27: 129–132.
  108. Reynolds D.J., T.G. Debney, G.A. Hall, L.H. Thomas and K.R. Parsons. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch. Virol.* 1985; 85(1–2): 71–83.
  109. Reynolds D.J., J.H. Morgan, N. Chanter, P.W. Jones, J.C. Bridger, T.G. Debney and K.J. Bunch. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* 1986; 119(2): 34–39.
  110. Rojas M., A. Manchego, C.B. Rocha, L.A. Fornells, R.C. Silva, G.S. Mendes, H.G. Dias, N. Sandoval, D. Pezo and N. Santos. Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian highland. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2016; 10(3): 269–274.
  111. Rota P.A., M.S. Oberste, S.S. Monroe, W.A. Nix, R. Campagnoli, J.P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M.H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J.L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D.D. Erdman, T.C. Peret, C. Burns, T.G. Ksiazek, P.E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCausland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouquier, S. Gunther, A.D. Osterhaus, C. Drosten, M.A. Pallansch, L.J. Anderson and W. J. Bellini. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science.* 2003; 300(5624): 1394–1399.
  112. Sabir J.S., T.T. Lam, M.M. Ahmed, L. Li, Y. Shen, S.E. Abo-Aba, M.I. Qureshi, M. Abu-Zeid, Y. Zhang, M.A. Khiyami, N.S. Alharbi, N.H. Hajrah, M.J. Sabir, M.H. Mutwakil, S.A. Kabli, F.A. Alsulaimany, A.Y. Obaid, B. Zhou, D.K. Smith, E.C. Holmes, H. Zhu and Y. Guan. Co-circulation of three

- camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science*. 2016; 351(6268): 81–84.
113. Saif L.J. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell. Vet.* 1990; 80(4): 303–311.
114. Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–364.
115. Saif L.J. and K. Jung. Comparative pathogenesis of bovine and porcine respiratory coronaviruses in the animal host species and SARS-CoV-2 in humans. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(8).
116. Saif L.J., D.R. Redman, P.D. Moorhead and K.W. Theil. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.* 1986; 47(7): 1426–1432.
117. Smits J.E. A brief review of infectious and parasitic diseases of wapiti, with emphasis on western Canada and the northwestern United States. *Can. Vet. J.* 1991; 32(8): 471–479.
118. Stokstad M., T.B. Klem, M. Myrmel, V.S. Oma, I. Toftaker, O. Osteras and A. Nodtvedt. Using biosecurity measures to combat respiratory disease in cattle: the norwegian control program for bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 167.
119. Storz J., X. Lin, C.W. Purdy, V.N. Choujenko, K.G. Kousoulas, F.M. Enright, W.C. Gilmore, R.E. Briggs and R.W. Loan. Coronavirus and Pasteurella infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(9): 3291–3298.
120. Storz J., C.W. Purdy, X. Lin, M. Burrell, R.E. Truax, R.E. Briggs, G.H. Frank and R.W. Loan. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytopidal viruses, and Pasteurella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000; 216(10): 1599–1604.
121. Storz J., L. Stine, A. Liem and G.A. Anderson. Coronavirus isolation from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996; 208(9): 1452–1455.
122. Su S., G. Wong, W. Shi, J. Liu, A.C.K. Lai, J. Zhou, W. Liu, Y. Bi and G.F. Gao. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends. Microbiol.* 2016; 24(6): 490–502.
123. Suzuki T., Y. Otake, S. Uchimoto, A. Hasebe and Y. Goto. Genomic Characterization and Phylogenetic Classification of Bovine Coronaviruses Through Whole Genome Sequence Analysis. *Viruses*. 2020; 12(2).
124. Takamura K., Y. Matsumoto and Y. Shimizu. Field study of bovine coronavirus vaccine enriched with hemagglutinating antigen for winter dysentery in dairy cows. *Can. J. Vet. Res.* 2002; 66(4): 278–281.
125. Terada Y., N. Matsui, K. Noguchi, R. Kuwata, H. Shimoda, T. Soma, M. Mochizuki and K. Maeda. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One*. 2014; 9(9): e106534.
126. Thomas C.J., A.E. Hoet, S. Sreevatsan, T.E. Wittum, R.E. Briggs, G.C. Duff and L.J. Saif. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. *Am. J. Vet. Res.* 2006; 67(8): 1412–1420.
127. Thomas L.H., R.N. Gourlay, E.J. Stott, C.J. Howard and J.C. Bridger. A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.* 1982; 33(2): 170–182.
128. Torres-Medina A., D.H. Schlafer and C.A. Mebus. Rotaviral and coronaviral diarrhea. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 1985; 1(3): 471–493.
129. Traven M., U. Carlsson, A. Lunden and B. Larsson. Serum antibodies to bovine coronavirus in Swedish sheep. *Acta. Vet. Scand.* 1999; 40(1): 69–74.

130. Traven M., K. Naslund, N. Linde, B. Linde, A. Silvan, C. Fossum, K.O. Hedlund and B. Larsson. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV — comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet. Microbiol.* 2001; 81(2): 127–151.
131. Tsunemitsu H., Z.R. el-Kanawati, D.R. Smith, H.H. Reed and L.J. Saif. Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12): 3264–3269.
132. Tsunemitsu H. and L.J. Saif. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch. Virol.* 1995; 140(7): 1303–1311.
133. Uttenthal A., N.P. Jensen and J.Y. Blom. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *Vet. Rec.* 1996; 139(5): 114–117.
134. van Reeth K. and H. Nauwynck. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 2000; 31(2): 187–213.
135. Vijgen L., E. Keyaerts, P. Lemey, P. Maes, K. Van Reeth, H. Nauwynck, M. Pensaert and M. Van Ranst. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *J. Virol.* 2006; 80(14): 7270–7274.
136. Vijgen L., E. Keyaerts, E. Moes, I. Thoelen, E. Wollants, P. Lemey, A.M. Vandamme and M. Van Ranst. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* 2005; 79(3): 1595–1604.
137. Wang Q., A.N. Vlasova, S.P. Kennedy and L.J. Saif. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr. Opin. Virol.* 2019; 34: 39–49.
138. Welter M.W. Adaptation and serial passage of bovine coronavirus in an established diploid swine testicular cell line and subsequent development of a modified live vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 440: 707–711.
139. Woo P.C., S.K. Lau, R.Y. Fan, C.C. Lau, E.Y. Wong, S. Joseph, A.K. Tsang, R. Wernery, C.C. Yip, C.C. Tsang, U. Wernery and K.Y. Yuen. Isolation and Characterization of Dromedary Camel Coronavirus UAE-HKU23 from Dromedaries of the Middle East: Minimal Serological Cross-Reactivity between MERS Coronavirus and Dromedary Camel Coronavirus UAE-HKU23. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(5).
140. Woo P.C., S.K. Lau, Y. Huang and K.Y. Yuen. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2009; 234(10): 1117–1127.
141. Woo P.C., S.K. Lau, U. Wernery, E.Y. Wong, A.K. Tsang, B. Johnson, C.C. Yip, C.C. Lau, S. Sivakumar, J.P. Cai, R.Y. Fan, K.H. Chan, R. Mareena and K.Y. Yuen. Novel betacoronavirus in dromedaries of the Middle East, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(4): 560–572.
142. Woode G.N., J.C. Bridger and A. Meyling. Significance of bovine coronavirus infection. *Vet. Rec.* 1978; 102(1): 15–16.
143. Workman A.M., L.A. Kuehn, T.G. McDanel, M.L. Clawson and J.D. Loy. Longitudinal study of humoral immunity to bovine coronavirus, virus shedding, and treatment for bovine respiratory disease in pre-weaned beef calves. *BMC Vet. Res.* 2019; 15(1): 161.
144. Wunschmann A., R. Frank, K. Pomeroy and S. Kapil. Enteric coronavirus infection in a juvenile dromedary (*Camelus dromedarius*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002; 14(5): 441–444.
145. Yang D.K., I.J. Hwang, B.H. Kim, C.H. Kweon, K.W. Lee, M.I. Kang, C.S. Lee and K.O. Cho. Serosurveillance of viral diseases in Korean native goats (*Capra hircus*). *J. Vet. Med. Sci.* 2008; 70(9): 977–979.

146. Yokoi K., H. Okazaki, K. Inahara and S. Hatama. Prevalence of eight bovine viruses in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Vet. Rec.* 2009; 165(25): 754–755.
147. Zhang X., K. Alekseev, K. Jung, A. Vlasova, N. Hadya and L.J. Saif. Cytokine responses in porcine respiratory coronavirus-infected pigs treated with corticosteroids as a model for severe acute respiratory syndrome. *J. Virol.* 2008; 82(9): 4420–4428.
148. Zhang X., M. Hasoksuz, D. Spiro, R. Halpin, S. Wang, A. Vlasova, D. Janies, L.R. Jones, E. Ghedin and L.J. Saif. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology.* 2007; 363(1): 1–10.
149. Zhang X.M., W. Herbst, K.G. Kousoulas and J. Storz. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *J. Med. Virol.* 1994; 44(2): 152–161. 38: 77–85.

# РОТАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Алексеев К.П., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И.

**Определение болезни.** Ротавирусная инфекция крупного рогатого скота — остро протекающее контагиозное заболевание, характеризующееся поражением желудочно-кишечного тракта (профузным поносом, обезвоживанием организма, развитием катарального или катарально-геморрагического гастроэнтерита), характерное преимущественно для новорожденных телят. Ротавирусы являются одной из основных причин диареи новорожденных телят, комплексного заболевания смешанной вирусно-бактериальной этиологии, которое наносит значительный экономический ущерб животноводству во всем мире [44]. Чаще всего ротавирусы обнаруживают в комплексе с калицивирусами, коронавирусами или криптоспоридиями [41]. Показано, что ротавирусная инфекция значительно усугубляет протекание бактериальных поражений пищеварительного тракта [46]. По современным оценкам, до 60% случаев гибели новорожденных телят связаны с развитием диареи новорожденных, ротавирусы при этом чаще всего связаны с наиболее ранними случаями этого заболевания, поражая телят в первые дни жизни.

Различные штаммы ротавирусов способны поражать молодняк всех млекопитающих, включая и человека, а также многие виды птиц. Особенностью ротавирусов КРС является их высокий антропозоонозный потенциал: были зафиксированы многочисленные случаи заражения человека штаммами ротавируса диареи новорожденных телят, что нехарактерно для ротавирусов, поражающих другие виды домашних и сельско-

хозяйственных животных, домашнюю птицу. Таким образом, контроль и специфическая профилактика ротавирусной инфекции КРС имеют особое значение в связи с опасностью возбудителя для человека. В тех регионах, где возможен постоянный и частый контакт человека и КРС, ротавирусы КРС могут оказывать влияние на эпидемиологическую ситуацию в популяции человека.

**Этиология.** Впервые роль ротавирусов в развитии диареи у сельскохозяйственных животных была описана после серии экспериментов на КРС в 1969 году [51]. С тех пор было показано, что ротавирусы участвуют в развитии острых кишечных инфекций у домашних и сельскохозяйственных животных, различных видов птицы. В 1973-м ученые из Австралии впервые выделили ротавирус от больного диареей ребенка [8]. Все ротавирусы имеют диаметр вириона 70 нм и характерную морфологию на изображении, полученном в электронном микроскопе, напоминая колесо с короткими спицами.

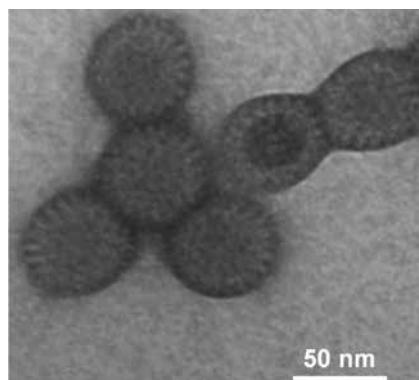


Рис. 1. Электронная микроскопия вирусных частиц ротавируса А (фото предоставлено Т.В. Гребенниковой)

Эта характерная морфология безоболочечного вириона ротавирусов и послужила причиной для их названия: *rota* на латыни означает ‘колесо’. Вирион ротавирусов — трехслойный, почти сферический икосаэдр. Внешний слой образован гликопротеином VP7, из которого выступают гомодимеры VP4. Средний слой образован белком VP6, самым массовым и иммуногенным в структуре вириона, коровая часть образована тремя белками, VP1, VP2 и VP3, окружающими сегментированную геномную РНК [37]. Геном ротавирусов представлен 11 сегментами двухцепочечной РНК, которые дают характерную картину полос на гель-электрофорезе. Такая организация генома позволяет различным штаммам ротавирусов обмениваться сегментами генома при коинфекции одного организма. Это явление известно как реассортация, характерное также для вируса гриппа и существенно повышающее потенциал изменчивости и адаптации вируса, облегчающее межвидовые переносы [16]. Помимо шести структурных белков сегментированный геном кодирует шесть неструктурных белков, NSP1-6, все сегменты геномной ДНК, за исключением одиннадцатого, моноцистронны, одиннадцатый кодирует два белка [37].

До конца 70-х годов все известные ротавирусы имели общий для этой группы антиген, однако позднее были обнаружены новые группы ротавирусов с другими антигенными свойствами. Первые были отнесены к группе А, а обнаруженные позднее и встречающиеся реже прочие ротавирусы были разделены на 7 групп с В по Н согласно антигенным свойствам [32]. Наиболее многочисленна и хорошо изучена группа А, представители которой играют важную роль в патологии человека и животных. Ротавирусы групп А, В и С обнаружены у человека и животных, D, E, F, G — только у животных [1, 2, 42, 43], последняя из описанных групп,

ротавирус Н, встречается у человека, свиней и летучих мышей [48]. Долгое время считалось, что основную роль в патологии КРС играют ротавирусы группы А. Однако в последнее десятилетие появляется все больше данных о распространении ротавирусов, не относящихся к группе А, и их участии в патологии у свиней [4, 21] и человека [3, 15, 52]. Было показано присутствие ротавирусов, не относящихся к группе А, в поголовье КРС, достоверно подтверждены ротавирусы групп В и С [14, 19, 35], однако их распространенность и роль в развитии диареи новорожденных телят еще предстоит прояснить. На сегодняшний день ряд исследований указывают на ассоциацию ротавирусов групп В и С КРС с диареей у взрослых животных [19, 35]. Сообщалось об обнаружении высоковирулентного ротавируса В у новорожденных козлят на ферме в Миннесоте, США. Причем после определения полной последова-

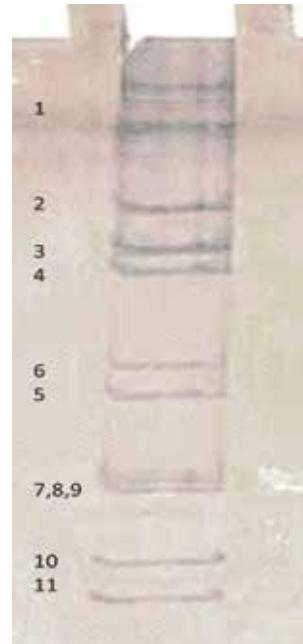


Рис. 2. Распределение сегментов РНК генома ротавируса А человека

тельности генома этого штамма выяснили, что этот вирус является типичным штаммом ротавируса В КРС, совершившим межвидовой переход [13]. Все группы ротавирусов имеют характерный для каждой группы уникальный рисунок миграции полос геномной РНК на гель-электрофорезе.

Ротавирусы группы А способны размножаться в культурах клеток, чаще всего в лабораториях для этого используют культуры клеток почки обезьяны. В зависимости от штамма ротавирусы А могут вызывать цитопатический эффект. Культивирование ротавирусов других групп не всегда возможно, хотя некоторые ротавирусы других групп свиного происхождения были успешно адаптированы к культуре клеток [42, 46].

Ротавирусы КРС группы А представляют особый интерес, так как зафиксированы случаи переноса штаммов диареи новорожденных телят РВА КРС человеку [23, 24, 26, 47, 50]. Определение генотипа штамма РВА имеет большое значение для оценки его зооантропонозного потенциала. В перекрестной реакции нейтрализации с использованием гипериммунной сыворотки к прототипному штамму ротавирусы группы А разделены на G-серотипы (VP7-гликопротеин) и P-серотипы (VP4-протеазочувствительный белок), а на основании сходства последовательности нуклеотидов этих генов — на G- и P-генотипы. Серотипы обозначают номерами, а генотипы — номерами в квадратных скобках. Номера G-серотипов и G-генотипов совпадают, а P-серотипов и P-генотипов различаются [25, 46]. В настоящее время все ротавирусы группы А подразделены на 27 G-серотипов/генотипов, 35 P-генотипов и 73 комбинации G/P-генотипов. Основным механизмом, отвечающим за возникновение новых штаммов ротавирусов, является рекомбинация (реассортация) геномных фрагментов при смешанной

инфекции [30, 31]. Генотипы ротавируса G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и в меньшей степени G12P[8] на данный момент являются самыми распространенными у человека во всем мире [33, 40, 43]. Кроме классификации по группам на основе VP6- и G/P-генотипов, выделяют типы ротавирусов на основе комбинации остальных генов. На основе сравнения полных последовательностей ротавирусных геномов и исключения из сравнения G- и P-генов были выделены 2 основных генотипа: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (генотип Wa) и I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (генотип DS-1) [20, 36]. Последний, менее распространенный у человека генотип DS-1 имеет несколько генных сегментов общего происхождения с ротавирусом КРС [34]. РВА КРС оказался распространенным в популяции человека на всех континентах, хотя случаи его обнаружения редки. У штаммов РВА КРС, преодолевших межвидовой барьер и обнаруженных у человека, характерные для КРС генотипы G6, G8 и G10 сочетаются с P[14] или P[11] на фоне генного набора I2-R2-C2-M2-A3/A11-N2-T6-E2-H3 [7, 22]. Комбинация генов этих ротавирусов оказалась сходной с атипичными P[14]-изолятами ротавируса человека [Ghosh 2010]. Всего для РВА КРС известно 12 G типов и 11 P типов (G1-G3, G5, G6, G8, G10, G11, G15, G17, G21 и G23; P[1], P[3], P[5-7], P[11], P[14], P[17], P[21], P[29] и P[33]) [14]. Самыми распространенными являются генотипы G6, G8 и G10 в сочетании с P[1], P[5] и P[11] [38]. Интересно, что наиболее распространенный в Индии генотип G10P[11] является одновременно и самым склонным к переходу в популяцию человека. На фоне большого количества тесных контактов и высокой скученности популяции КРС и человека в отдельных регионах Индии постоянно регистрируются случаи переноса РВА КРС G10P[11] от КРС к человеку [14].

**Эпизоотология (эпидемиология).** В поголовье скота основной группой, чувствительной к ротавирусной инфекции, являются новорожденные телята в возрасте 1–2 недель [14], острая инфекция у которых нередко заканчивается летальным исходом. У взрослых животных инфекция протекает бессимптомно: показано, что они могут заражаться ротавирусом и время от времени выделять его в окружающую среду на фоне отсутствия клинических симптомов, являясь источником инфекции в поголовье. При остром течении болезни значительные количества вируса выделяются вместе с фекалиями в течение 4–5 дней, затем происходит постепенное снижение выделения вируса. У бессимптомных взрослых носителей и у новорожденных телят в острой фазе инфекции выделяется большое количество инфекционного вируса, до  $10^{10}$  частиц на 1 грамм фекалий [14, 39]. При этом бессимптомные взрослые носители иногда выделяют такие количества вируса в течение нескольких недель. Фекально-оральная трансмиссия является основным путем заражения и была многократно подтверждена экспериментально. Минимальная заражающая доза не была определена экспериментально для телят, но в опыте на поросятах было показано, что всего 90 вирусных частиц достаточно для развития инфекции [14]. На открытом пастбище ротавирус способен быстро распространяться в поголовье КРС, особенно в период отела. При этом вирионы ротавируса имеют высокую устойчивость к факторам окружающей среды и способны долгое время сохранять инфекционную активность [10]. Такая комбинация бессимптомного носительства с выделением инфекционного вируса в значительных количествах с фекалиями и его устойчивость в окружающей среде способствует тому, что пораженные ротавирусом фермы могут служить источником заражения на про-

тяжении нескольких лет. На практике это приводит к тому, что почти во всех хозяйствах обнаруживаются антитела к ротавирусу. Мировые показатели распространенности ротавирусной инфекции КРС в хозяйствах варьируют от 7 до 94%, в зависимости от географического региона, хотя в среднем, согласно большинству исследований, этот показатель колеблется в пределах 30–40% [49].

Распространенность субклинической, бессимптомной инфекции может быть очень значительной. Было показано, что до 44% взрослых животных в хозяйствах, где присутствует ротавирус, выделяют с фекалиями комплексы вирус–антитело, и только 6% животных не выделяют вирус в свободном виде. Даже на фоне присутствия антител клинически здоровые взрослые животные могут по несколько недель выделять с фекалиями ротавирус. Телята также часто выделяют ротавирус на фоне бессимптомного протекания инфекции, хотя у некоторых таких животных в кишечнике обнаруживаются незначительные повреждения, и размножение ротавируса может быть подтверждено иммунологическим окрашиванием срезов тонкого кишечника [14].

Во время масштабного исследования в Испании среди новорожденных телят с диареей ротавирус был обнаружен у 43% животных. Сопутствующие инфекции (чаще всего, в 85% случаев — *Cryptosporidium*) были подтверждены у 58% животных с ротавирусной диареей. Встречаемость других энтеропатогенов на фоне ротавирусной инфекции в этом исследовании была следующей: 20% коронавирус, 17% *E. coli* K99, 2% *Salmonella spp.* По мере увеличения возраста телят снижалась частота встречаемости сопутствующих инфекций [14]. Аналогичные данные были получены в исследовании поголовья КРС в Нидерландах [6].

**Патогенез.** Ротавирусы размножаются преимущественно в зрелых, неделяющихся энтероцитах, расположенных на кончиках кишечных ворсинок тонкого кишечника, и приводят к гибели этих клеток [45, 46]. Наступает момент, когда потеря пораженных ротавирусом энтероцитов перестает компенсироваться их заменой на новые клетки, образующиеся в крипте, что приводит к атрофии ворсинок, нарушению пищеварения и диарее [18, 45]. На фоне гибели пораженных ротавирусом энтероцитов на кончиках кишечных ворсинок клетки кишечной крипты продолжают свои нормальные секреторные функции, которые более не уравновешиваются всасыванием кишечными волосками. Секреция перевешивает всасывание, что усугубляет диарею. Увеличивается осмотическое давление в просвете кишечника, привлекая дополнительное количество жидкости по мере того, как лактоза и другие непереваренные питательные вещества проходят по кишечнику и ферментируются в прямой кишке в летучие жирные кислоты. Бактериальная ферментация непереваренной лактозы приводит к образованию D- и L-изомеров молочной кислоты, у телят с диареей абсорбция медленно метаболизируемого D-изомера может приводить к системному накоплению этого метаболита, тем самым способствуя развитию метаболического ацидоза и клинической депрессии. У пораженных телят развивается обезвоживание и потеря электролитов разной степени тяжести [39].

Среди ротавирусов КРС встречаются штаммы с разной вирулентностью [9, 11, 12, 14]. Вирулентные штаммы способны к более быстрому размножению в эпителии кишечника, что приводит к серьезным повреждениям, компенсировать которые до появления клинических признаков организм не успевает. Появлялись отдельные сообщения о ротавирусной виремии и репликации вируса в печени,

о некоторых других механизмах патогенеза, однако значительна ли их роль в патогенезе ротавирусной диареи, остается неясным [16, 28]. Данные о патогенезе ротавирусов, не относящихся к группе A, также указывают на то, что в его основе лежит заражение и разрушение энтероцитов ворсинок кишечника [42, 46]. Некоторые из этих вирусов вызывали образование синцитиев и более тяжелую инфекцию, чем ротавирусы A КРС.

Ротавирусная диарея имеет комплексную природу. Различные факторы влияют на ее развитие: это и нарушение всасывания в кишечнике в связи с гибелю энтероцитов на ворсинках, нарушение структуры самих ворсинок, активация вегетативной нервной системы кишечника, а также то, что вирусный белок NSP4 является энтеротоксином [5, 16, 27].

**Клиническая картина.** Инкубационный период ротавирусной диареи КРС короткий, варьирует от 18 до 48 часов в зависимости от возраста животного и инфекционной дозы вируса. Инкубационный период оканчивается диареей, характер стула зависит от диеты. У телят, питающихся молоком, фекалии желтые или белые, от водянистых до более густых, по консистенции напоминающих сливки, иногда с хлопьями, выделения объемные [12]. Присутствие крови в выделениях не характерно для ротавирусной инфекции. В результате диареи может наступить обезвоживание или дисбаланс электролитов. Нарушается всасывание кишечником питательных веществ, что провоцирует развитие вторичных инфекций. Не всякая ротавирусная инфекция вызывает развитие клинической картины, субклинические инфекции могут быть воспроизведены экспериментально и распространены в хозяйствах [9, 12, 45]. Хотя обычно тяжелое течение болезни с выраженной клинической картиной характерно для ново-

рожденных телят, в экспериментальных условиях телята с наивным иммунитетом оставались восприимчивы к ротавирусной инфекции до возраста 16 недель [12]. В поголовье свиней большое влияние на течение ротавирусной инфекции в условиях конкретного хозяйства оказывает присутствие в молоке материнских антител. Однако у коров уровень антител в молоке быстро падает и к четвертому дню после родов снижается ниже протективного уровня, в результате даже телята на подсосе на 4–5-й день после рождения оказываются чувствительными к ротавирусной инфекции [39].

Из факторов, влияющих на тяжесть протекания ротавирусной инфекции, следует отметить возраст животного, иммунологический статус матери (наличие колостральных вируснейтрализующих антител), температуру окружающей среды, заражающую дозу вируса, частоту кормления и присутствие других энтеропатогенов. Смертность наиболее высока среди самых молодых телят, получивших недостаточное количество молозива и оказавшихся в неблагоприятных погодных условиях [14]. Таким образом, для стада на открытом выпасе холодный сезон является зоной риска и временем, на которое приходится основное количество случаев диареи новорожденных. Ротавирусы КРС вносят значительный вклад в развитие зимней дизентерии КРС, сезонного заболевания множественной этиологии.

Проявления ротавирусной инфекции в хозяйствах могут значительно различаться в зависимости от упомянутых выше факторов. Иногда заболевание проявляется у 5–10% животных в первый год, затрагивая до 50–80% телят на третий год после проникновения в хозяйство. В других хозяйствах вспышка ротавирусной диареи происходит сразу, затрагивая до 80% телят. Смертность также зависит от многих причин

и колеблется в пределах от 5% до 60%. Основными факторами, определяющими смертность, являются уровень колостральных антител и наличие сопутствующих инфекций, а также условия содержания скота в хозяйстве [14].

**Патологоанатомические изменения.** Показано, что патологические изменения, связанные с ротавирусной инфекцией, ограничены тонким кишечником. На микроскопическом уровне наблюдается вакуолизация и гибель энteroцитов [16]. Инфицирование и гибель энteroцитов на ворсинках тонкого кишечника ведет к гиперплазии крипты и атрофии ворсинок, степень тяжести которой зависит от штамма ротавируса, его инфекционной дозы и наличия в кишечнике материнских антител [18, 46]. Воспалительные изменения в тонком кишечнике уменьшены в сравнении с другими энтеропатогенами. Интересно, что в ряде случаев начало диареи у телят наступает ранее появления видимых признаков поражения кишечника. Ротавирусные антигены могут быть выявлены в пораженных энteroцитах с помощью иммунологического окрашивания групп-специфическими антисыворотками [10, 39].

**Диагностика.** Подозрение на ротавирусную природу диареи у новорожденных телят обосновано в случаях, когда фекалии имеют белый, кремовый или яркий желтый цвет, вязкие и обильные. Однако часто для естественной ротавирусной инфекции характерно и субклиническое течение [45].

Диарея новорожденных может быть связана с другими вирусами или бактериями. В полевых условиях вместе с ротавирусами часто обнаруживают коронавирусы, калицивирусы, *E. coli* K99, кокцидии и криптоспоридии. Клинические признаки и возрастное распределение не позволяют четко дифференцировать ротавирус от других инфекционных агентов [10, 39].

Основным методом лабораторной диагностики является исследование фекалий на присутствие ротавирусных частиц. Для выявления антигена ротавируса А доступны коммерческие тесты, основанные на иммуноферментном анализе (ИФА). Изначально разработанные для выявления антигена РВА человека, эти тест-системы универсальны и могут применяться для выявления антигена РВА КРС благодаря наличию общего групп-специфического антигена [29]. Определение G- и P-генотипа РВА, а также выявление ротавирусов, не относящихся к группе А, проводят с помощью ОТ-ПЦР [46]. В случае выделения значительных количеств ротавируса с фекалиями, РВА можно дискриминировать от остальных известных ротавирусов методом электрофореза вирусной РНК в полиакриламидном геле (ПААГ): только РВА имеют характерный триплет фрагментов РНК, образованный сегментами генома 7, 8 и 9 [10].

Интерпретация присутствия ротавирусов, однако, сложнее их детекции. Редкие животные не имеют антител к ротавирусу, субклиническая инфекция очень распространена в хозяйствах у телят первых недель жизни, на которые как раз и приходится пик ротавирусной диареи [45]. Если образцы отобраны только у телят с диареей, это может усложнить постановку диагноза; рекомендуется параллельно отобрать образцы у здоровых телят той же возрастной группы, затем сопоставить количество положительных образцов в двух выборках [10]. Наиболее точным подтверждением прямой связи между обнаруженным ротавирусом и диареей у телят является иммунологическое окрашивание срезов тонкого кишечника. Наличие антигена ротавируса в энteroцитах кишечных ворсинок доказывает то, что именно ротавирус явился причиной диареи [14, 37].

Выявление ротавирус-специфических антител в сыворотках крови новорожденных телят не имеет диагностического смысла, так как в первые недели жизни у большинства животных сохраняются высокие титры материнских антител [10, 39].

**Специфическая профилактика.** Специфическая профилактика должна сопровождаться соблюдением санитарных норм. Из-за высокой устойчивости вирионов к факторам окружающей среды и высоких титров выделения ротавируса с фекалиями в острой фазе инфекции ротавирусы в условиях хозяйств способны накапливаться, сохраняться и долгое время служить источником заражения. В хозяйствах, где наблюдают ротавирусную диарею новорожденных, рекомендуются меры, приводящие к снижению заражающей дозы вируса, чтобы пассивно приобретенные антитела могли облегчить протекание инфекции. Поэтому для таких хозяйств рекомендуют систему «пусто-занято» с возможно полным удалением контаминированной подстилки и очисткой помещений [10, 14].

Иммунитет слизистой оболочки кишечника, иммуноглобулины класса А, имеют большее значение для защиты организма от ротавирусной инфекции, чем антитела крови. Присутствие достаточного количества иммуноглобулинов А в кишечнике можно достичь за счет хранения молозива и его ежедневного выпаивания телятам небольшими порциями [14]. Несколько производителей предлагают коммерческие вакцинныепреимущества для иммунизации коров перед отелом. Применение этих препаратов обусловливает повышение уровня нейтрализующих ротавирусных антител в молозиве и молоке и продление их выделения. Это позволяет снизить титры ротавируса в кишечнике теленка, соответственно снизить уро-

вень повреждений ворсинок тонкого кишечника, что дает организму теленка время на выработку собственного активного иммунитета [14, 39]. Были разработаны вакцины для стимуляции активного иммунитета у новорожденных, однако их эффективность остается недоказанной [10].

## Литература

1. Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики. Вопросы вирусологии. 2016; 61(4): 154–159. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-154-159>.
2. Сергеев В.А, Непоклонов, Е.А., Алипер, Т.И. Ротавирусы // Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика. 2007; 365–369.
3. Alam M.M., Pun S.B., Gauchan P., Yokoo M., Doan Y.H., Tran T.N., Nakagomi T., Nakagomi O., Pandey B.D. The first identification of rotavirus B from children and adults with acute diarrhoea in Kathmandu, Nepal. Tropical medicine and health. 2013; 41(3): 129–134. <https://doi.org/10.2149/tmh.2013-15>.
4. Alekseev K.P., Penin A.A., Mukhin A.N., Khametova K.M., Grebennikova T.V., Yuzhakov A.G., Moskvina A.S., Musienko M.I., Raev S.A., Mishin A.M., Kotelnikov A.P., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Nepoklonov E.A., Herrera-Ibata D.M., Shepherd F.K., Marthaler D.G. Genome characterization of a pathogenic porcine rotavirus B strain identified in Buryat Republic, Russia in 2015. Pathogens (Basel, Switzerland). 2018; 7(2): 46. <https://doi.org/10.3390/pathogens7020046>.
5. Ball J. M., Tian P., Zeng C.Q., Morris A.P., Estes M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. Science (New York, N.Y.). 1996; 272(5258): 101–104. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.101>.
6. Bartels C.J., Holzhauer M., Jorritsma R., Swart W.A., Lam T.J. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Preventive veterinary medicine. 2010; 93(2–3): 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.09.020>.
7. Bhandari N., Rongsen-Chandola T., Bavdekar A., John J., Antony K., Taneja S., Goyal N., Kawade A., Kang G., Rathore S.S., Juvekar S., Mulyil J., Arya A., Shaikh H., Abraham V., Vrati S., Proschan M., Kohberger R., Thiry G., Glass R. et al. India Rotavirus Vaccine Group. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet (London, England), 2014; 383(9935): 2136–2143. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62630-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62630-6).
8. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., & Ruck B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet (London, England). 1973; 2(7841): 1281–1283. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(73\)92867-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)92867-5).
9. Bridger J.C. A definition of bovine rotavirus virulence. The Journal of general virology. 1994; 75(10): 2807–2812. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2807>.
10. Bridger J. Rotavirus infection of the digestive tract. In Infectious and parasitic diseases of livestock, 1st Ed (Lefevre P.C., Blancou J., Chermette R., Uilenberg G., eds). CABI. 2010; 539–544.
11. Bridger J.C., Burke B., Beards G.M., Desselberger U. The pathogenicity of two porcine rotaviruses differing in their *in vitro* growth characteristics and genes 4. The Journal of general virology. 1992; 73(11): 3011–3015. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-11-3011>.

12. Bridger J.C., Pocock DH. Variation in virulence of bovine rotaviruses. *The Journal of hygiene*. 1986; 96(2): 257–264. <https://doi.org/10.1017/s0022172400066031>.
13. Chen F., Knutson T.P., Ciarlet M., Sturos M., Marthaler D.G. Complete genome characterization of a rotavirus B (RVB) strain identified in Alpine goat kids with enteritis reveals inter-species transmission with RVB bovine strains. *The Journal of general virology*. 2018; 99(4): 457–463. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001022>.
14. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H., Grünberg W., Radostits O.M. Viral diarrhea in Calves, Lambs, Kids, and Foals. In: *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier. 2017; 384–392.
15. Diller J.R., Parrington H.M., Patton J.T., Ogden K.M. Rotavirus species B encodes a functional fusion-associated small transmembrane protein. *Journal of virology*. 2019; 93(20); e00813-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00813-19>.
16. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 6th Ed. (Knipe D.M., Howley P.M., eds). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. PA. 2013; 1347–1401.
17. Ghosh S., Alam M.M., Ahmed M.U., Talukdar R.I., Paul S.K., Kobayashi N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *The Journal of general virology*. 2010; 91(9): 2367–2373. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022244-0>.
18. Hall G.A., Bridger J.C., Parsons K.R., Cook R. Variation in rotavirus virulence: a comparison of pathogenesis in calves between two rotaviruses of different virulence. *Veterinary pathology*. 1993; 30(3): 223–233. <https://doi.org/10.1177/030098589303000302>.
19. Hayashi-Miyamoto M., Murakami T., Minami-Fukuda F., Tsuchiaka S., Kishimoto M., Sano K., Naoi Y., Asano K., Ichimaru T., Haga K., Omatsu T., Katayama Y., Oba M., Aoki H., Shirai J., Ishida M., Katayama K., Mizutani T., Nagai M. Diversity in VP3, NSP3, and NSP4 of rotavirus B detected from Japanese cattle. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2017; 49: 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.003>.
20. Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Patton J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *Journal of virology*. 2008; 82(22): 11106–11116. <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-08>.
21. Homwong N., Diaz A., Rossow S., Ciarlet M., Marthaler D. Three-level mixed-effects logistic regression analysis reveals complex epidemiology of swine rotaviruses in diagnostic samples from North America. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0154734. doi: 10.1371/journal.pone.0154734. PMID: 27145176; PMCID: PMC4856330.
22. Iturriza-Gómara M., Dallman T., Bányai K., Böttiger B., Buesa J., Diedrich S., Fiore L., Johansen K., Koopmans M., Korsun N., Koukou D., Kroneman A., László B., Lappalainen M., Maunula L., Marques A.M., Matthijnssens J., Midgley S., Mladenova Z., Nawaz S. et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiology and infection*. 2011; 139(6): 895–909. <https://doi.org/10.1017/S0950268810001810>.
23. Komoto S., Adah M.I., Ide T., Yoshikawa T., Taniguchi K. Whole genomic analysis of human and bovine G8P[1] rotavirus strains isolated in Nigeria provides evidence for direct bovine-to-human interspecies transmission. *Infection, genetics*

- and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2016; 43: 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.023>.
24. Komoto S., Pongsuwan Y., Tacharoenmuang R., Guntapong R., Ide T., Higo-Moriguchi K., Tsuji T., Yoshikawa T., Taniguchi K. Whole genomic analysis of bovine group A rotavirus strains A5-10 and A5-13 provides evidence for close evolutionary relationship with human rotaviruses. *Veterinary microbiology*. 2016; 195: 37–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.09.003>.
  25. Koopmans M., Brown D. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway: 1992). Supplement. 1999; 88(426): 14–19. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1999.tb14320.x>
  26. Kumar N., Malik Y.S., Sharma K., Dhama K., Ghosh S., Bányai K., Kobayashi N., Singh R.K. Molecular characterization of unusual bovine rotavirus A strains having high genetic relatedness with human rotavirus: evidence for zoonanthropotonic transmission. *Zoonoses and public health*. 2018; 65(4): 431–442. <https://doi.org/10.1111/zph.12452>.
  27. Lundgren O., Peregrin A.T., Persson K., Kordasti S., Uhnoo I., Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* (New York, N.Y.). 2000; 287(5452): 491–495. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.491>.
  28. Lundgren O., Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and infection*. 2001; 3(13): 1145–1156. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01475-7](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01475-7).
  29. Maes R.K., Grooms D.L., Wise A.G., Han C., Ciesicki V., Hanson L., Vickers M.L., Kanitz C., Holland R. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(1): 290–294. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.290-294.2003>.
  30. Matthijnssens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Bányai K., Rahman M., Zeller M., Beutels P., Van Damme P., Van Ranst M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future microbiology*. 2009; 4(10): 1303–1316. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.96>.
  31. Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Bányai K., Brister J.R., Buesa J., Esona M.D., Estes M.K., Gentsch J.R., Iturriza-Gómara M., Johne R., Kirkwood C.D., Martella V., Mertens P.P., Nakagomi O., Parreño V., Rahman M., Ruggeri F.M., Saif L.J. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*. 2011; 156(8): 1397–1413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>.
  32. Matthijnssens J., Otto P.H., Ciarlet M., Desselberger U., Van Ranst M. & Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*. 2012; 157(6): 1177–1182. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>.
  33. Matthijnssens J., Rahman M., Ciarlet M., Van Ranst M. Emerging human rotavirus genotypes. In: Palombo E.A., Kirkwood C.D., editors. *Viruses in the environment*. Trivandrum (India): Research Signpost. 2008; 171–219.
  34. Matthijnssens J., Rahman M., Van Ranst M. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *The Journal of general virology*. 2008b; 89(10): 2630–2635. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003780-0>.
  35. Mawatari T., Hirano K., Tsunemitsu H., Suzuki, T. Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003–2010. *The Journal of general virology*. 2014; 95(5): 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/vir.0.062166-0>.
  36. McDonald S.M., Matthijnssens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S.,

- Lemey P., Zeller M., Van Ranst M., Spiro D.J., Patton J.T. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS pathogens*. 2009; 5(10): e1000634. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000634>.
37. Palmarini M. Reoviridae. In: Fenner's Veterinary Virology. 5th Ed. (MacLachlan N.J., Dubovi E.J., eds). Academic Press. 2017; 299–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00015-5>.
38. Papp H., László B., Jakab F., Ganesh B., De Grazia S., Matthijnssens J., Ciarlet M., Martella V., Bányai K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary microbiology*. 2013; 165(3–4): 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.020>.
39. Peek S.F., McGuirk S.M., Sweeney R.W., Cummings K.J. Infectious diseases of the gastrointestinal tract. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. 2018; 249–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39055-2.00006-1>.
40. Rahman M., Matthijnssens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K., Iturriza-Gómara M., Iftekharuddin N., Azim T., Van Ranst M. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *Journal of virology*. 2007; 81(5): 2382–2390. <https://doi.org/10.1128/JVI.01622-06>.
41. Reynolds D.J., Morgan J.H., Chantler N., Jones P.W., Bridger J.C., Debney T.G., Bunch K.J. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *The Veterinary record*. 1986; 119(2): 34–39. <https://doi.org/10.1136/vr.119.2.34>.
42. Saif L.J. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: Current Topics in Microbiology and Immunology (Jiang B., Ramig R.F., eds). Berlin: Springer-Verlag. 1994; 185: 339–371.
43. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56.
44. Scott A.W., Gunn G. The costs of bovine enteritis in suckled calves. *Scottish Agricultural Economics Review* (United Kingdom). 1995.
45. Scott P., Hall G., Jones P. and Morgan J.H. Calf diarrhea. In: *Bovine medicine*. 2nd Ed (Andrews A., Blowey R., Boyd H. and Eddy R., eds). Blackwell publishing. Oxford. 2004; 185–214.
46. Shepherd F.K., Freeman M.J., Culhane M.R., Marthaler, D.G. Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses) // *Disease of swine*, 11th Ed. (Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Zhang J., eds). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2019; 715–727. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch43>.
47. Sieg M., Rückner A., Köhler C., Burgener I., Vahlenkamp T.W. A bovine G8P[1] group A rotavirus isolated from an asymptotically infected dog. *The Journal of general virology*. 2015; 96(1): 106–114. <https://doi.org/10.1099/vir.0.069120-0>.
48. Suzuki T., Inoue D. Full genome-based genotyping system for rotavirus H and detection of potential gene recombination in nonstructural protein 3 between porcine rotavirus H and rotavirus C. *The Journal of general virology*. 2018; 99(12): 1582–1589. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001162>.
49. Swiatek D.L., Palombo E.A., Lee A., Coventry M.J., Britz M.L., Kirkwood C.D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. *Veterinary microbiology*. 2010; 140(1–2): 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.020>.
50. Tacharoenmuang R., Komoto S., Gunapong R., Ide T., Singchai P., Upachai S., Fukuda S., Yoshida Y., Murata T., Yoshikawa T., Ruchusatsawat K., Moto-

- mura K., Takeda N., Sangkitporn S., Tani-guchi K. Characterization of a G10P[14] rotavirus strain from a diarrheic child in Thailand: Evidence for bovine-to-human zoonotic transmission. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2018; 63: 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.009>.
51. Theil K. Group A rotaviruses. In: *Viral diarrheas of man and animals* (Saif L.J. and Theil K., eds). CRC Press. Boca Raton. Florida. 1990; 35–72.
52. Zhirakovskaya E., Tikunov A., Klemesheva V., Loginovskikh N., Netesov S., Tikunova N. First genetic characterization of rotavirus C in Russia. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016; 39: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.001>.

# АДЕНОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Шемелькова Г.О., Забережный А.Д.

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота (*Bovine adenoviral infection*) — остро протекающая болезнь телят, характеризующаяся поражением органов дыхания, пищеварения, лимфоидной ткани и конъюнктивитом [3, 10].

Этиология. Возбудитель относится к семейству *Adenoviridae*, которое получило свое название от древнегреческого *adēnes* — ‘гланды’ или ‘железа’, поскольку впервые аденовирус человека был выделен в 1953 году из тканей удаленных при операции гландин у детей. Впервые аденовирус КРС был выделен американскими исследователями в 1959 г., в последующем аденовирусы КРС были выделены в 1965 году в Англии, в 1966 году в Венгрии и Голландии, в 1970 году в Японии, позже в других странах мира. В СССР проблематикой аденовируса КРС занимались Алиева Н.А. (1967 г.), Гуненков В.В. (1972 г.), Белоусова Р.В. (1984–1987 гг.) [7, 11].

К настоящему времени выделены и классифицированы 11 генотипов аденовируса КРС (*Bovine adenovirus*, BAdV), относящихся к родам *Mastadenovirus* (BAdV-1, -2, -3, -9 и -10) и *Atadenovirus* (BAdV-4, -5, -6, -7, -8 и -Rus). Род *Mastadenovirus* получил свое название от древнегреческого *mastikó adéna* — ‘молочная железа’, род *Atadenovirus* так назван из-за того, что в ДНК представителей этого рода содержится большое количество пар А- и Т-нуклеотидов [7, 19].

В целях упрощения классификации в 2013 году Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) изменил названия видов всех аденовирусов

(код постановления: 2013.003aV), внеся в название указание рода. Было введено 4 вида аденовируса КРС: *Bovine mastadenovirus A* (включает тип BAdV-1), *Bovine mastadenovirus B* (BAdV-3), *Bovine mastadenovirus C* (BAdV-10) и *Bovine atadenovirus D* (BAdV-4, -5, -8, -Rus). Типы BAdV-2 и BAdV-9 были включены в виды *Ovine mastadenovirus A* и *Human mastadenovirus C* соответственно. Позже, в 2015 году в Международный комитет по таксономии вирусов было представлено предложение классифицировать еще два вида аденовируса КРС — *Bovine atadenovirus E* (который бы включал BAdV-6) и *Bovine atadenovirus F* (который бы включал BAdV-7), на данный момент это предложение не утверждено, хотя в базе данных GenBank уже имеется полногеномный сиквенс аденовируса КРС BAdV-6. При этом допустимо старое использование названий вирусов, штаммов, изолятов [11, 15, 18, 21].

Вирионы аденовируса КРС представляют собой изометрические частицы диаметром 70–90 нм, которые состоят из сердцевины, содержащей ДНК и белки, и икосаэдрического капсида. Суперкапсидная оболочка отсутствует [11].

Икосаэдрический капсид построен из 252 капсомеров: 240 из них гексоны, образующие 20 триангулярных граней, а 12 — пентоны, располагающиеся на вершинах икосаэдра. Структурно пентоны состоят из двух субединиц: закрепленного в капside основания и выступающего за пределы капсида отростка (фибрillы) длиной 9–78 нм, имеющего на конце булавовидное утолщение (рис. 1).

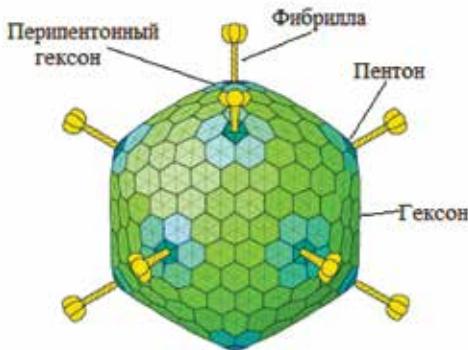


Рис. 1. Капсид адено-вируса  
(*ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics*)

Наиболее изученным основным структурным белком адено-вируса является гексон, имеющий шестиугольную форму и окруженный шестью другими такими же гексонами; исключение составляют перипентонные гексоны, которые расположены комплексом из пяти штук вокруг пентона. Гексон состоит из трех одинаковых белков (белок II, 110–120 кДа каждый), таким образом, основная масса белка вириона приходится на белок II, имеющий сложную антигенную структуру. В ходе развития адено-вирусной инфекции гексон накапливается в больших количествах, при этом подавляющая его часть (70–90%) не участвует в построении вириона, а остается в виде растворенного антигена, структурно и иммунологически идентичного гексону, входящему в состав вириона.

Пентон построен из 5 белков (белок III, 85 кДа), обладает выраженной эндо-нуклеазной активностью, что обеспечивает токсическую активность адено-вируса. Белок III чувствителен к действию протеолитических ферментов и вызывает ранний цитопатический эффект.

Белки IIIa (66 кДа) и VI (24 кДа) придают стабильность связи пентона с перипентонными гексонами (рис 2).

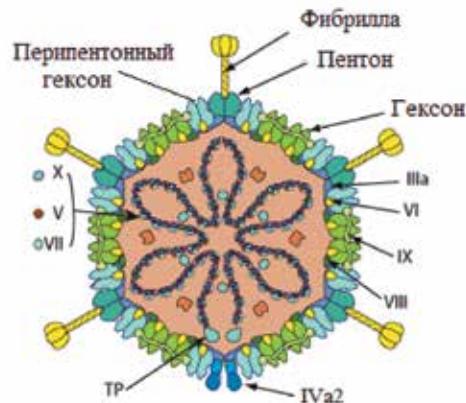


Рис. 2. Белки адено-вируса  
(*ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics*)

Белок VIII (13 кДа), располагаясь с внутренней стороны капсида, придает дополнительную структурную устойчивость вириону. Белок IX (12 кДа) — компонент вириона адено-вируса, образующий трискелионные структуры, которые состоят из трех молекул, стабилизирующих три гексоновых тримера в центре каждой икосаэдрической грани, фиксируя гексоны.

Фибрилла построена из трех гликозилированных белковых молекул (белок IV, 62 кДа), отвечает за распознавание рецепторов на клеточной мембране и адсорбцию вирионов на поверхности клетки.

Белки V (48,5 кДа), VII (18,5 кДа) и X (10 кДа), располагаясь в сердцевине вириона, обеспечивают правильную укладку молекулы ДНК внутри капсида. Белок IVa2 необходим для инкапсулирования вирусного генома в предварительно собранный капсид или пре-капсид при сборке новых вирионов адено-вируса [7, 10, 11, 14, 22, 24].

Основные антигенные детерминанты адено-вируса располагаются в гексоне и пентоне (включая фибриллы), которые в том числе содержат: родо-, группо-, межгруппо-, подгруппо- и типоспецифические антигенные детерминанты [7, 11].

В составе гексона обнаружены две антигенные детерминанты: родоспецифическая ( $\alpha$ -ориентирована внутрь вириона) и типоспецифическая ( $\beta$ -экспонирована на поверхности вириона). Наиболее консервативными являются родоспецифические антигенные детерминанты, типоспецифические же более изменчивы [11].

Геном адено-вирусов представлен линейной двуспиральной молекулой

ДНК, состоящей из 26–48 тысяч пар нуклеотидов. ДНК фланкирована инвертированными концевыми последовательностями, позволяющими формировать кольца за счет образования водородных связей между концами одной и той же цепи. На 5'-конце ДНК адено-вируса имеется терминальный белок — ТР (55 кДа) (рис. 2) [7, 24, 26].

Проникновение адено-вируса в клетку происходит посредством клатрин-опос-

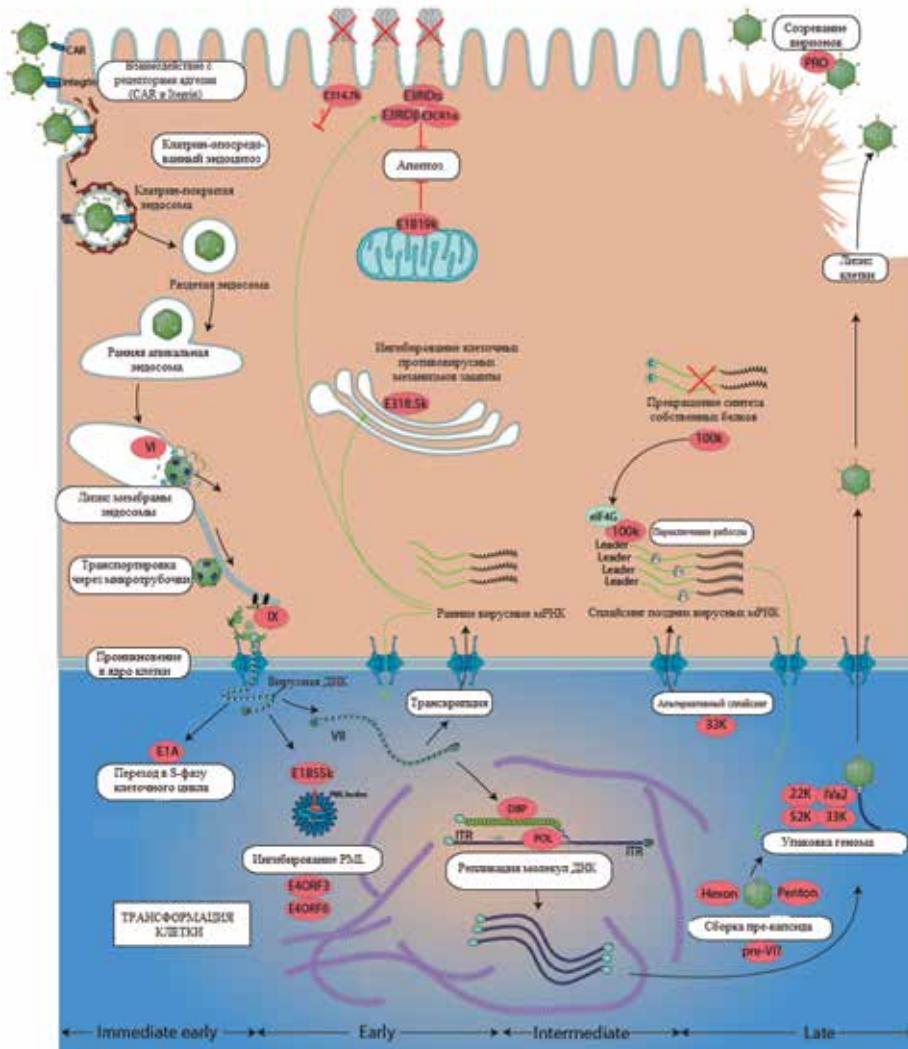


Рис. 3. Репликация аденоовириуса (*ViralZone*, Swiss Institute of Bioinformatics)

редованного эндоцитоза с использованием рецепторов CAR (*Coxsakievirus and Adenovirus Receptor*) и интегрина. В дальнейшем аденоовирус освобождается от клатриновой белковой оболочки и разрушает эндосомальную мембрану при помощи белка VI, в результате чего вирусный вирион выходит в цитозоль клетки. В течение следующих 2 часов происходит доставка вириона к ядру клетки посредством микротрубочек (рис. 3) [7, 11, 22].

В непосредственной близости от клеточного ядра происходит «раздевание» капсида, ДНК вируса проникает в ядро, где чаще всего существует в виде эпизомы, значительно реже происходит интегрирование вирусной ДНК в хромосомы клетки.

Для предотвращения развития противовирусных механизмов клетки аденоовирус, находясь внутри клеточного ядра, ингибирует промиелоцитарный лейкозный белок (The Promyelocytic Leukemia Protein), который функционально предназначен для подавления репликации/транскрипции вирусов.

Аденоовирус ингибирует синтез собственных клеточных нуклеиновых кислот и других белков, параллельно запуская синтез вирусных мРНК.

Транскрипция генов осуществляется клеточной РНК-полимеразой, получившей название POL II. Сначала синтезируются так называемые ранние вирусные мРНК с генов E (E-early), данный процесс запускается до начала репликации вирусной ДНК. Ранние вирусные мРНК кодируют в основном белки, непосредственно необходимые для репликации ДНК аденоовируса. «Поздние» вирусные мРНК синтезируются с генов L (L-late) после репликации вирусной ДНК и кодируют преимущественно структурные белки капсида. Вирусные мРНК подвергаются сплайсингу [7, 11, 22].

Сборка вириона аденоовируса происходит в ядре клетки хозяина. Сначала

строится белковый прообраз капсида, который включает в себя белки-предшественники, после этого вирусная ДНК, ассоциированная с белками сердцевины, проникает внутрь недостроенного капсида, после чего он уплотняется за счет расщепления белков-предшественников [22].

Выход готовых вирионов из клетки не всегда сопровождается лизисом последней, поэтому клетка часто остается хронически инфицированной [7, 22].

Размножаясь в перевиваемых культурах клеток, аденоовирус КРС вызывает цитопатогенное действие, которое выражается в дегенерации клеток зараженного монослоя. Они увеличиваются, округляются, образуют конгломераты, вследствие чего происходит разрушение монослоя. Также аденоовирус вызывает формирование внутриядерных включений.

Аденоовирус КРС весьма устойчив к воздействию факторов окружающей среды. Многократное замораживание и оттаивание не снижает его инфекционности. В зависимости от изолята инактивируется в течение 30–60 минут при температуре 56°C, в течение 10–30 минут — при температуре 70°C, при этом полевые штаммы вируса более устойчивы, чем эталонные. При температуре 4°C аденоовирус сохраняет свою инфекционную активность более 6 месяцев, при 24°C — 1–3 месяца, при 36°C — 15–60 дней. Аденоовирус выдерживает воздействие ультрафиолетовых лучей в течение 30–60 минут, устойчив к изменению уровня pH среды в пределах 5,0–9,0. В лиофилизированном состоянии аденоовирус можно хранить более 5 лет [10, 11].

**Эпизоотология.** Основные пути заражения аденоовирусом — алиментарный, воздушно-капельный или через конъюнктиву глаза. В качестве источника возбудителя выступают больные и переболевшие животные, выделяющие

вирус в окружающую среду с истечениями из носа, глаз, фекалиями, мочой. Факторами передачи инфекции могут служить корма, вода, подстилка, предметы инвентаря, загрязненные адено-вирусом КРС [2, 3, 7].

Наиболее подвержены заболеванию телята от 2-недельного до 4-месячного возраста, особенно остро оно протекает у молодняка 2–3-недельного возраста. Экспериментальную инфекцию удалось воспроизвести только на животных 15–30-дневного возраста [4, 9, 10].

Однако, по данным японских ученых, им удалось воспроизвести инфекцию на животных и более старшего возраста. Для этого они использовали две группы телят голштинской породы семисуточного и трехмесячного возраста ( $n=3$  в каждой группе), которых эндобронхиально заражали адено-вирусом КРС III-го типа (BAdV-3). У подопытных животных в обеих группах отмечали развитие некротического бронхита и пневмонии, сопровождающиеся клеточной инфильтрацией и пролиферацией пневмоцитов II-го типа. У семисуточных телят в измененных эпителиальных клетках были обнаружены внутриядерные тельца-включения и выделен антиген BAdV-3, чего не наблюдали у трехмесячных животных. Напротив, только у трехмесячных телят в легочных очагах поражения были обнаружены специфические CD-8 Т-лимфоциты. Такая разница в иммунопатологических реакциях разновозрастных групп телят, по-видимому, обусловливается различиями в развитии иммунной системы животных [11, 23].

Adaïr и коллеги, проведя изучение влияния адено-вируса КРС I-го типа (BAdV-1) на альвеолярные макрофаги КРС *in vitro*, установили, что его воздействие на клетки уменьшает экспрессию Fc-рецепторов, снижает функциональ-

ную активность системы комплемента и в целом снижает фагоцитарную активность в отношении *Candida krusei* [12].

Аденовирусы в целом являются иммунодепрессантами и способствуют развитию других инфекционных патологий. В настоящее время до конца не выяснена роль адено-вируса КРС в развитии комплексной респираторной и/или кишечной патологии телят инфекционного происхождения — является ли адено-вирусная инфекция вторичной, развивающейся на фоне воздействия других вирусов, или же адено-вирус является одним из спусковых крючков, снижающих резистентность организма и открывающих путь другим инфекционным агентам, в том числе и бактериальной природы. Несмотря на это, адено-вирус КРС часто является одним из этиологических агентов смешанных респираторных и/или кишечных заболеваний телят, выступая в ассоциации с другими вирусными (вирусом вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальным вирусом, рота- и коронавирусами КРС), бактериальными (пастереллы, эшерихии, манхемия) агентами и/или микоплазмами [5, 8, 10, 11, 16, 20].

Данные серологической диагностики подтверждают широкое распространение адено-вирусной инфекции КРС как на территории нашей страны, так и за рубежом [2, 4, 6, 9, 11, 20].

В условиях промышленного животноводства заболевание часто возникает в зимне-весенние месяцы при комплектовании групп телят или их перегруппировке. Стресс, вызванный изменениями в условиях окружающей среды, рациона и транспортировкой животных, неудовлетворительное санитарно-гигиеническое состояние помещений также являются факторами риска возникновения адено-вирусной инфекции [3, 11, 20].

### **Патогенез и клинические признаки.**

При респираторном пути заражения первичная локализация аденоовируса КРС в организме животных происходит в органах верхних дыхательных путей, откуда вирус проникает в лимфоидную ткань (лимфатические узлы и пр.), затем в кровь, легкие, органы пищеварительного тракта, центральную нервную систему [7].

Инкубационный период составляет от 4 до 7 суток. Клиническое проявление болезни может выражаться пневмонией, энтеритом, пневмоэнтеритом, конъюнктивитом. Соответственно проявляются характерные клинические признаки: повышение температуры тела до 41,5°C, серозные истечения из носа и глаз, переходящие в гнойные, затрудненное дыхание, кашель. Также отмечается общая слабость, снижение аппетита, тимпания, колики, диарея (фекалии могут быть с примесью крови и/или кусочков слизистой оболочки кишечника).

Гибель может наступить через 1–3 сутки после начала проявления клинических признаков, смертность среди телят раннего возраста достигает 60% [3, 10, 11].

Аденоовирусная инфекция сопровождается иммуносупрессией и провоцирует развитие вторичных инфекций. В зависимости от возраста, условий кормления и содержания животных, а также проведения соответствующего лечения может варьировать тяжесть и продолжительность течения болезни. Болезнь может переходить в хроническую форму, переболевшие телята — отставать в росте и развитии [5, 6].

Выделение аденоовируса КРС из носовых смыков, тканей почек, testicул и крови клинически здоровых животных подтверждает возможность латентного вирусоносительства (у более взрослых животных) [7, 13].

Все перечисленные признаки присущи многим вирусным и бактериальным инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота [3, 8].

**Патологоанатомические изменения.** При поражении органов дыхания наблюдают закупорку бронхов некротическими массами, уплотнения, ателектаз и эмфизему легких. При поражении желудочно-кишечного тракта находят признаки катарального и/или геморрагического воспаления слизистых оболочек [2, 25].

Кроме того, отмечают увеличение печени, дегенеративные изменения лимфатической системы (анемия и отек лимфатических узлов), признаки нарушения кровообращения (кровоизлияния и пр.) [3, 11].

При гистологических исследованиях выявляют гиперплазию, слущивание эпителия бронхов, многочисленные скопления лейкоцитов вокруг небольших кровеносных сосудов. Обнаруживают внутриядерные включения в клетках различных органов и тканей: легких, эндотелии кровеносных сосудов, лимфоузлах, селезенке, печени, почках, слизистой оболочки трахеи, бронхов и желудочно-кишечного тракта [3, 7].

**Диагностика.** Диагноз на аденоовирусную болезнь КРС ставится комплексно на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений с обязательным подтверждением лабораторными методами. Следует отметить, что для постановки окончательного диагноза лабораторные исследования имеют решающее значение, так как ряд вирусных и бактериальных инфекций может вызывать сходные формы патологий [2, 6, 11].

Отбор патологического материала проводят в первые 2–3 дня болезни от больных животных с выраженной клинической картиной или от животных в острой стадии заболевания, убитых для диагностических исследований.

В целях выявления вируса или его ДНК от животных берут смывы со слизистой оболочки носа, глаз и прямой кишки. Для проведения серологических исследований используют парные пробы сыворотки крови, полученные от одного животного с интервалом 15–60 суток.

У животных, убитых для диагностических исследований, берут кусочки легких и бронхов, селезенки, лимфоузлов, пораженные участки слизистых оболочек носовой и ротовой полости, трахеи, кишечника.

Лабораторную диагностику осуществляют по следующим направлениям:

- выделение возбудителя (в чувствительной культуре клеток) или его ДНК и последующая идентификация (электронным микроскопированием, с использованием серологических реакций: РСК, РИФ, РДП, ИФА, методом секвенирования);
- обнаружение антигена в патологическом материале в серологических реакциях: РИФ, РСК, РДП, ИФА.
- ретроспективная диагностика (выявление антител в парных пробах сыворотки крови больных и переболевших животных): РН, РЛА, РНГА, РТГА, РСК, РДП [1, 2, 6, 11, 17].

После экспериментального заражения телят на пятые сутки в сыворотке крови обнаруживали вируснейтрализующие антитела, на десятые сутки их уровень увеличивался более чем в 4 раза [10].

Ввиду большой схожести клинико-эпизоотических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для адено-вирусной болезни КРС, с другими инфекциями, поражающими респираторный и желудочно-кишечный тракты, необходима дифференциальная диагностика от заболеваний, вызываемых вирусами вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальным вирусом, рота- и коронавирусами КРС,

а также от заболеваний, вызываемых *P. multocida*, *M. haemolytica*, *E. coli*, микоплазмами и т.д. [1, 2, 10, 11].

Следует учитывать тот факт, что адено-вирусная инфекция часто встречается в ассоциированной форме с вышеуказанными болезнями [3, 4, 9, 11, 20].

**Профилактика.** Неспецифическая профилактика адено-вирусной инфекции КРС направлена на недопущение заноса возбудителя в хозяйство и поддержание здоровья животных на высоком уровне. То есть необходимо соблюдать весь комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий по соблюдению биологической безопасности и обеспечить животным хорошие условия кормления и содержания.

Для этого необходимо выдерживать на карантине вновь поступающих животных; проводить своевременную дезинфекцию помещений, оборудования, транспорта; организовать поддержание нормального микроклимата в помещениях; обеспечить животных сбалансированным рационом [8, 11].

У переболевших животных иммунитет сохраняется до 5 месяцев, при этом они могут оставаться вирусносителями, и воздействие различных неблагоприятных факторов может спровоцировать повторное заболевание и выделение адено-вируса в окружающую среду [3, 7].

Для специфической профилактики адено-вирусной инфекции обосновано применение соответствующих вакцинных препаратов [4, 10, 11, 15].

Двукратная иммунизация моновакциной против адено-вируса КРС коров на 7–8 месяце стельности вызывает формирование вируснейтрализующих антител в сыворотке крови (и затем в молозиве) на уровне 1:512–1:1024, который сохранялся высоким на протяжении до 6 месяцев (срок наблюдения) после отела. Уровень антител в молозиве снижался быстрее, чем в сыворотке

крови. У телят, получавших молозиво от вакцинированных коров, пассивные вируснейтрализующие антитела выявляли до 78-суточного возраста в титре 1:4–1:8 [10, 15].

При двукратной вакцинации телят максимальный уровень вируснейтрализующих антител был зафиксирован на 14-е сутки (1:256–1:512) с последующей тенденцией к снижению через 6 недель до 1:128, через 13 недель до 1:4–1:8 [10, 11].

В РФ для специфической профилактики аденовируса КРС, а также инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиального, рота- и коронавируса КРС разработана и разрешена к практическому применению инактивированная комбинированная семикомпонентная вакцина «КОМБОВАК-А» (производитель ООО «Ветбиохим», Россия) [11].

**Лечение.** Лечение аденовирусной инфекции проводится комплексно, с использованием специфических и неспецифических средств терапии.

При проведении специфического лечения применяют гипериммунные сыворотки, содержащие антитела к аденовирусу КРС. В России выпускается гипериммунная сыворотка «Имуносерум» для лечения и профилактики вирусных пневмоэнтеритов телят (ФГУП «Армавирская биофабрика», Россия), содержащая в своем составе специфические антитела против аденовируса, вирусов парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, ротавируса и коронавируса крупного рогатого скота. Больным телятам сыворотку вводят внутримышечно или внутривенно. Также возможно применение сыворотки с профилактической целью для новорожденных телят. Возможно добавление сыворотки в молозиво (молоко) для выпаивания телят [11].

В качестве неспецифической терапии применяются симптоматические средства (направленные на купирование симптомов заболевания и поддержание жизненных функций организма теленка), антибиотики и другие противомикробные препараты, направленные на подавление вторичной бактериальной (грибной, микоплазменной) инфекции. Положительный лечебный эффект при лечении оказывают иммуномодуляторы и иммуностимуляторы, аэрозоли лекарственных и дезинфицирующих средств [3].

## Литература

1. Белоусова Р.В., Третьякова И.В. Иммуноферментный метод диагностики аденовирусной инфекции КРС. Достижения науки и техники АПК. 1990; 1: 25–27.
2. Белоусова Р.В. Лабораторная диагностика и специфическая профилактика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М., 1989.
3. Бессарабов Б.Ф., Вишутин А.А., Воронин Е.С. и др. Инфекционные болезни животных: учебник для студентов высших учебных заведений. Под ред. А.А. Сидорчука. М.: Колос. 2007; 671.
4. Вазир Я. Технология приготовления и антигенные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота. Дис. ... канд. вет. наук. М., 2008.
5. Глотов А.Г., Глотова Т.Н., Строганова И.Я. Вирусные болезни крупного рогатого скота при интенсивном ведении молочного животноводства. Краснояр. гос. аграр. ун-т. 2010; 188.
6. Лобова Т.П. Усовершенствование лабораторной диагностики аденови-

- русной инфекции крупного рогатого скота. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2006.
7. Львов Д.К., Алипер Т.И., Верховский О.А. и др. Руководство по вирусологии. Под ред. Д.К. Львова. М.: Медицинское информационное агентство. 2013; 1200.
  8. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика. 2007; 524.
  9. Строганова И.Я. Распространение adenovirusной инфекции крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Восточной Сибири. Вестник КрасГАУ. 2011; 4: 108–110.
  10. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИИТИБП. 1998; 928.
  11. Шемелькова Г.О. Выделение и анализ биологических свойств adenovirusа крупного рогатого скота в качестве компонента инактивированной комбинированной вакцины. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2020.
  12. Adair B.M., McNulty M.S., Foster J.C. Effects of two adenoviruses (type 1 and type 8) on functional properties of bovine alveolar macrophages *in vitro*. Am. J. Vet. Res. 1992; 53: 1010–1014.
  13. Babiuk L.A., Mittal S.K., Tikoo S.K., Van Donkersgoed J., Beskorwayne T., Godson D.L. Experimental inoculation of heifers with bovine adenovirus type 3. Can. J. Vet. Res. 1999; 63(2): 153–156.
  14. Benkő M., Harrach B.D. Molecular evolution of adenoviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2003; 272: 30–35.
  15. Burki F. Experimental Adenovirus Vaccines in Cattle. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1973; 163(7): 897–900.
  16. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H., Grünberg W. Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 11 edition. Elsevier. 2017; 2339.
  17. Harrach B. Adenoviruses: general features. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. 2014.
  18. Harrach B. Available adenovirus sequences. 2019. <http://www.vmri.hu/~harrach/ADENOSEQ.HTM>.
  19. Harrach B., Benkő M., Both G.W., Brown M., Davison A.J., Echavarria M. et al. Family Adenoviridae Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier. 2011; 125–141.
  20. Kale M., Ozturk D., Hasircioglu S., Pehlivanoglu F., Turutoglu H. Some viral and bacterial respiratory tract infections of dairy cattle during the summer season. Acta Veterinaria. 2013; 63(2–3): 227–236.
  21. Lehmkühl H.D., Hobbs L.A. Serologic and hexon phylogenetic analysis of ruminant adenoviruses. Arch. Virol. 2008; 153: 891–897.
  22. Liu H., Naismith J.H., Hay R.T. Adenovirus DNA replication. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2003; 272: 131–164.
  23. Narita M., Yamada M., Tsuboi T., Kawashima K. Immunohistopathology of calf pneumonia induced by endobronchiak inoculation with bovine adenovirus 3. Vet. Pathol. 2002; 39: 565.
  24. San Martin C. Latest insights on adenovirus structure and assembly. Viruses. 2012; 4(5): 847–877.
  25. Smyth J.A., Moffett D.A., van Garderen E., Orr J.P. Examination of adenovirus-types in intestinal vascular endothelial inclusions in fatal cases of enteric disease in cattle, by *in situ* hybridization. Vet. Microbiol. 1999; 70: 1–6.
  26. Yuan-Mao Zhu, Zuo Yu, Hong Cai, Yu-Ran Gao, Xiu-Mei Dong, Zhao-Li Li, Hong-Fei Shi, Qing-Feng Meng, Chuang Lu, Fei Xue. Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China. Virology Journal. 2011; 8: 557.

# РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL INFECTION, BRSV)

Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г.

Респираторно-синцитиальная инфекция — экономически значимая контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся поражением респираторного тракта крупного рогатого скота. У восприимчивых животных вирус вызывает бронхиолиты, бронхиты, интерстициальную пневмонию и эмфизему легких. Вирус может действовать как моноагент или быть одним из компонентов «респираторного комплекса» наряду с вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота [3, 8, 16, 25, 32, 36]. Описано синергическое взаимодействие вируса и бактерий *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* и *Mycoplasma bovis* [7, 19–20, 27, 47, 79].

В неосложненных случаях экономический ущерб складывается из снижения эффективности кормления, привесов, продолжительности жизни, молочной продуктивности взрослых животных, снижения репродуктивных качеств племенных животных, а также затрат на лечение, вакцинацию и другие хозяйствственные мероприятия. В промышленном животноводстве при смешанных респираторных болезнях ежегодный ущерб может достигать 1 млрд USD [20, 27–28, 39, 61].

**Историческая справка.** Вирус впервые был выделен в 1969 году в Швейцарии от телят с признаками тяжелой респираторной болезни [54], а позднее — от больных животных в Европе, Америке и Азии [54, 74]. Впервые о выявлении вируса в СССР сообщалось в 1975 г. [10].

**Возбудитель.** Оболочечный и полиморфный вирус с отрицательно заряженной РНК длиной около 15000 нуклеотидов, кодирующими 10 белков. Длительное время возбудитель классифицировался как респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (PCB КРС, BRSV) и относился к роду *Pneumovirus* семейства *Paramyxoviridae*, но в 2018 г. классификация была пересмотрена и агент был перенесен во вновь сформированное семейство *Pneumoviridae*, рода *Orthopneumovirus* и назван *Bovine orthopneumovirus* [42].

В антигенном отношении он тесно связан с респираторно-синцитиальным вирусом человека, овец и коз [73]. Некоторые аспекты эпидемиологии и патогенеза инфекции человека и крупного рогатого скота имеют сходство. В связи с отсутствием надежной лабораторной модели респираторно-синцитиальной инфекции человека экспериментальное заражение телят BRSV используется для изучения эффективности лекарственных препаратов и вакцин [12, 18, 69, 73].

Вирус очень чувствителен к воздействиям факторов внешней среды, в частности к замораживанию и оттаиванию, низким значениям pH. При +4°C он сохраняет активность в течение 1 нед., при минус 70°C — до 2 мес. Температура +56°C полностью снижает его инфекционную активность за 30 мин.; +37° — за 24 ч.

**Характеристика вириона.** Вирусные частицы полиморфные или филаментозные, размером 35–150 нм в диаметре. Оболочка вируса состоит из липидов клетки-хозяина. Она перекрыта винтовым нуклеокапсидом, состоящим из

нуклеопротеина N, фосфопротеина P, РНК-полимеразависимого протеина L и геномной РНК. Дополнительным является матричный протеин M, формирующий слой на внутренней поверхности мембраны и транскрипционный антитерминальный фактор M2-1. Геном также кодирует РНК-регуляторный протеин M2-2 и два неструктурных протеина NS1 и NS2. Гемагглютинин отсутствует [47].

*Геном вириуса* представляет единую полинуклеотидную нить, содержащую, помимо генов, концевые участки, лидерный на 3'-конце (около 50 п.о.) и трейлерный на 5'-конце (50–161 п.о.). Структура генома сложная и включает 10 генов, отделенных друг от друга межгенными участками различной длины (1–56 п.о.). В конце нуклеотидной последовательности каждого гена имеется короткий олигоуридиловый участок, являющийся сигналом полиаденилирования и одновременно сигналом терминации синтеза мРНК. В начале каждого присутствует консервативный и сходный у всех генов участок, функционирующий как сигнал транскрипции после ее терминации [73].

Репликация вириуса происходит в цитоплазме. Цикл репродукции начинается с прикрепления вириуса к клеточной поверхности и слияния вириусной оболочки с плазматической мембраной. В результате слияния липидных слоев оболочки вириуса и плазматической мембранны образуется пора, через которую

нуклеокапсид проникает в цитоплазму, где начинается транскрипция вирусных генов находящейся в составе нуклеокапсида вириусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Целостность нуклеокапсида при этом сохраняется. Полимераза, транскрибируя геномную РНК, сдвигает чехол, образованный белком N, но не устраняет его, и после прохождения полимеразного комплекса структура нуклеокапсида на транскрибиированном участке восстанавливается.

*Протеины вириуса* [47, 59, 73]. Геном вириуса кодирует десять протеинов (G, F, NS1, NS2, SH, M1, M2, N, P, L), характеристика которых представлена на рис. 1.

Протеин G является самым большим и выполняет функцию главного белка, ответственного за прикрепление вириуса к клеточной стенке, а также главного протективного антигена вириуса.

Протеин F обеспечивает слияние вириуса с клетками и отвечает за пенетрацию вириуса, высвобождая нуклеокапсид и способствуя проникновению его в цитоплазму инфицированных клеток, а также за слияние клеточных мембран между инфицированными и неинфицированными клетками, способствуя образованию синцитиев и многоядерных гигантских клеток. Индуцирует выработку вируснейтрализующих антител и обеспечивает резистентность организма животного к инфекции. Этот протеин высоко консервативен у изолятов

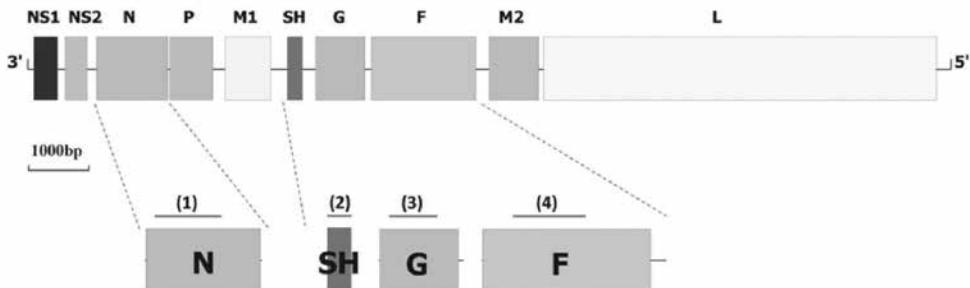


Рис. 1. Схема генома ортопневмовируса крупного рогатого скота [59]

вируса, является обязательным для репликации вируса и синтезируется в качестве предшественника, который расщепляется на две субъединицы F1 и F2.

Считается, что гены F и G играют важную роль в вирусной инфекционности и являются основными мишениями иммунной системы [47, 73].

Вирусные белки, формирующие нуклеокапсид, включают белок нуклеокапсида (N), фосфопротеин (P) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L). Кроме них, у вируса выявлены матриксный протеин, состоящий из двух форм (M1 и M2) и два неструктурных протеина — NS1 и NS2. Неструктурные протеины NS1 и NS2 играют важную роль в устойчивости вируса к воздействию  $\alpha$  и  $\beta$  интерферона, а также в патогенезе болезни и во взаимодействии вируса и организма восприимчивого животного.

*Протеины нуклеокапсида.* Нуклеокапсид длиной 391 аминокислотных последовательностей состоит из нуклеокапсида (N), фосфопротеина и полимеразы (L). В комбинации с белками P, L и M2 он представляет главный элемент нуклеокапсида и защищает геном вируса от РНК-азы. Протеин P отвечает за транскрипцию и репликацию вируса.

*Матриксные протеины.* Вирус содержит 3 матриксных протеина. Протеин M расположен на внутренней поверхности оболочки вируса и играет важную роль в формировании вирусоподобных частиц. Протеин M1 является анти-терминальным фактором, промотором элонгации транскрипционных цепей и повышает частоту считывания генов. M2 протеин опосредует регуляционный переход от транскрипции к репликации РНК.

*Небольшой гидрофобный SH протеин.* Короткий составной мембранный белок, который не является необходимым для репликации вируса, а его функция до конца не изучена. Возможно, он играет роль в вирус-опосредованном кле-

точном слиянии путем взаимодействия с протеином F.

*Антигенные и генетические подгруппы вируса.* При помощи моноклональных антител к протеину G была осуществлена классификация вируса на 4 антигенных подгруппы: A, B, AB и нетипируемую. При помощи сиквенса установлено существование шести генетических подгрупп на основании протеина G и пяти на основе F или N [48, 59]. Предполагается существование новой подгруппы вируса в Бразилии [49, 62].

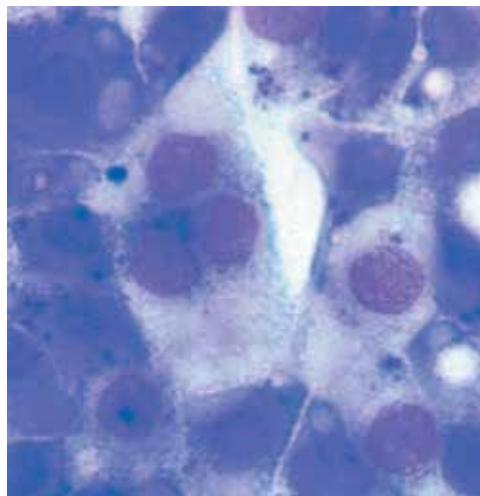
Подгруппа I состоит из старых европейских штаммов, выделенных до 1976 г. Подгруппа III включает штаммы исключительно из Соединенных Штатов. Подгруппы II, IV, V и VI полностью состоят из «более молодых» европейских изолятов. Штаммы из Северной Европы, Дании и Швеции группируются в подгруппу II, а штаммы из Нидерландов, Бельгии и Франции — в подгруппы II, IV, V и VI [48, 59].

Было показано, что один штамм или группа близкородственных штаммов могут инфицировать конкретное стадо животных в определенный период времени. В ходе исследований выявили также недостаточную эффективность вакцин у животных, инфицированных штаммами вируса V и VI групп, указывающую на то, что коммерческие вакцины неэффективны против инфекций, вызываемых штаммами этих подгрупп. Кроме того, также наблюдалась непрерывная эволюция белков N, G и F, что, по-видимому, коррелировало с внедрением вакцинации в разных странах. Кроме того, сильная положительная селекция была выявлена в муциноподобной области белка G и в определенных сайтах белков N и F [48]. Эти наблюдения подтверждают непрерывную модификацию высококонсервативной центральной области иммунодоминантного G-белка, что подчеркивает важ-

ность учета эволюции BRSV в рациональной разработке вакцин.

Степень генетического разнообразия вируса ограничивается 15% в пределах одной подгруппы. Биологическое значение этих подгрупп неизвестно, однако мутации в области иммунодоминантного региона (АА 174–188) протеина G снижают степень перекрестной защиты между вакцинированными и полевыми штаммами вируса [47–48]. Эти данные свидетельствуют о том, что в популяции BRSV возникают и существуют «квазивиды» вируса.

При размножении в чувствительных культурах клеток вирус вызывает в них очень специфические изменения, аналогичные изменениям в легких больных животных, выявляемых при гистологических исследованиях. Эти изменения получили название «синцитии», т.е. скопления нескольких клеток, слившихся друг с другом, и содержащих несколько ядер, что и легло в основу названия вируса (*рис. 2*).



**Рис. 2. Перевиваемая линия культуры клеток ТЭБ через 96 часов после заражения РСВ КРС. Образование гигантских многоядерных клеток (синцитии).**

**Окраска по Романовскому–Гимза (фото Глотовой Т.И.)**

**Эпизоотология.** Болезнь распространена во всем мире, что вероятнее всего является результатом прямого перемещения скота при торговле. В странах с умеренным климатом вспышки болезни обычно происходят осенью и зимой, однако могут возникать и летом. Степень распространенности BRSV-инфекции в разных географических регионах сильно варьирует. На нее влияет только движение крупного рогатого скота, поскольку насекомые-переносчики и сперма быков-производителей не играют роли в передаче вируса. Независимо от географического местоположения показатели инфицированности животных довольно высокие. Трансмиссия вируса внутри стад обычно происходит воздушно-каспельным, реже контактным путем, а заражение — только через дыхательные пути. Распространение вируса между стадами случается только при прямом введении животного, выделяющего вирус, или косвенным путем при посещении ферм визитерами [3, 11, 41, 58, 65]. В редких случаях овцы и козы могут иметь некоторое эпизоотологическое значение.

К инфицированию вирусом восприимчив крупный рогатый скот всех пород и возрастов, однако чаще болеют телята от 4 недель до года, иногда с рождения до двухнедельного возраста. Мясной скот болеет тяжелее [47, 78]. В некоторых случаях вспышки болезни регистрируют у взрослых животных, что связано с заносом возбудителя в неиммунное стадо или реинфекцией в стационарно неблагополучных хозяйствах [53, 65]. Основные факторы риска возникновения респираторно-синцитиальной инфекции: большие размеры стада, высокая концентрация животных на единицу площади, закуп животных со стороны, постоянные внутри хозяйствственные передвижения, высокая молочная продуктивность коров, снижение естественной резистентности животных, колебания

температуры, неудовлетворительные условия кормления и содержания.

Дополнительными факторами являются стрессы, резкое понижение температуры окружающего воздуха, отсутствие или низкие титры колостральных антител, ранний отъем телят от коров-матерей, ветеринарно-зоотехнические мероприятия в раннем возрасте, гипоавитаминозы, смешивание телят из разных источников, скученность. Как правило, клинические признаки появляются через 7–10 (иногда 30) дней после воздействия стрессов на организм животных. Улучшение санитарно-гигиенических показателей снижает инцидентность и тяжесть течения болезни, а также риск осложнения ее бактериальными инфекциями [58–59].

Оценить реальную степень распространения и инцидентности этой инфекции сложно, и в практических условиях часто она не диагностируется, а ее течение «маскируется» другими вирусными или бактериальными агентами, и эти показатели определяются эпизоотологией других инфекций.

Серопозитивность животных во всех странах, где проводились исследования, колеблется в пределах 30–100%. Высокая степень превалентности специфических антител к вирусу свидетельствует о том, что болезнь является энзоотической и чаще проявляется спорадически, особенно на группах неммунных телят.

В некоторых странах с умеренным климатом частота возникновения вспышек инфекции высокая, и считается, что вирус является причиной 60% энзоотических вспышек респираторных болезней молодняка КРС в молочных и 70% — в мясных стадах [47].

Риск инфицирования животных коррелирует с их популяционной плотностью в конкретном географическом регионе и возрастом. Опасность возник-

новения болезни у взрослого крупного рогатого скота трудно оценить вследствие высокого уровня серопозитивности. Высокую восприимчивость к заражению вирусом проявляют молодые не иммунные к вирусу животные, а относительная устойчивость взрослого скота объясняется приобретенным иммунитетом, вызванным многократным контактом с возбудителем в течение жизни или вакцинацией. Поэтому в стадах животных, не имеющих иммунитета к вирусу, болезнь может проявляться на всех возрастных группах, а при постоянной циркуляции вируса в стаде, т.е. при энзоотическом течении — только у телят [2, 3, 47, 58–59, 65].

При первичных и повторных вспышках болезни в осенне-зимний период заболеваемость достигает 60–100%, однако летальность в неосложненных случаях низкая и не превышает 5–10% (иногда 20%). В другие сезоны года вспышки болезни происходят редко. В закрытых стадах КРС молочного или мясного направления регулярные повторные вспышки болезни происходят чаще у телят при комплектовании сборным поголовьем, связанным с внутрихозяйственными перемещениями. Может происходить реинфекция животных без проявления клинических признаков болезни. В связи с этим в стадах с энзоотическим течением инфекции часто регистрируют вспышки болезни среди телят младших возрастов после ввода их в основное стадо [47, 59].

Неизвестно, какие факторы способствуют возникновению повторных вспышек болезни и происходит ли циркуляция вируса между животными или стадами в межэпизоотический период. Механизмы, ответственные за выживание вируса в конкретной популяции, до конца не изучены. В качестве объяснения высказываются три гипотезы.

Согласно первой, предполагается наличие латентной формы инфекции в ста-

ционарно неблагополучном стаде, объясняющей внезапные вспышки болезни на изолированно выращиваемых телях, а также в стадах, в которых вспышки болезни регистрировались много лет назад [47, 58]. Вирус сохраняется в скрытом (латентном) состоянии летом и реактивируется зимой. Несмотря на регулярные реинфекции, циркуляции вируса среди молодняка весной или летом нет или она происходит на очень низком уровне. Возможно, в этот период вирус находится в организме коров в скрытом состоянии, а его реактивация и выделение происходит после воздействия стрессов, и они служат источником возбудителя для неиммунных телят [2, 3, 47]. Опасность представляет также инфицированный молодняк старших возрастов, служащий источником вируса для телят младшего возраста. Однако это предположение не находит подтверждения.

Другим предположением является то, что болезнь протекает по типу «транзитной» инфекции, которая возникает у восприимчивых животных, не имеющих иммунитета к вирусу. Она характеризуется высокой заболеваемостью и низкой летальностью. Выделение вируса происходит в течение короткого периода времени и может прекращаться после начала выработки специфических антител. Сероконверсию выявляют у животных через 3–4 недели после выздоровления. Неизвестно, элиминируется вирус из организма переболевшего животного или нет. В период вспышки число животных, выделяющих вирус, может быть значительным, так как в этом случае имеет место «эстафетная» передача возбудителя с вовлечением в процесс большого количества неиммунных особей, которые сами начинают выполнять функцию временного (транзитного) источника возбудителя инфекции. В некоторых случаях при повторных вспышках в стационарных очагах инфекции может происходить

повторное инфицирование иммунных животных [47, 58].

Учитывая то, что вирус может выделяться от животных без симптомов болезни в течение 6 мес., предполагается, что в его распространении могут играть роль взрослые животные с хроническими формами болезни, а также персистентно инфицированные телята, начинаяющие выделять вирус при определенных условиях. Не исключается значимость только клинически больных животных как наиболее вероятных источников вируса при повторных вспышках болезни, введенных в стадо до начала новой вспышки [58].

Третьим, возможно ключевым, объяснением является антигенная и генетическая нестабильность вируса. Молекулярные исследования подтвердили существование антигенной дивергенции и генетической вариабельности среди полевых изолятов вируса [48]. Штаммы вируса, выделенные от животных одного стада во время первичных вспышек болезни, идентичны, в отличие от штаммов, выделенных при повторных вспышках болезни в стадах, куда новые животные не вводились 10 лет. Они значительно различаются (до 11%), что предполагает постоянную эволюцию и циркуляцию разных квазивариантов вируса. Результатом такой эволюции является также появление и доминирование над старыми новых высоковирулентных штаммов вируса. Источником таких штаммов могут быть всего одно или несколько животных, инфицирующих особей, с наличием иммунитета к штамму другого подтипа, занесенному в хозяйство много лет назад [35, 47, 58, 59].

Характерная гетерогенность вирусного генома и низкая точность его репликации являются одними из наиболее важных особенностей, которые вирус использует для выживания и сохранения в организме животного и в популяции

крупного рогатого скота в межэпизоотические периоды. Вирус непрерывно эволюционирует самостоятельно в ответ на воздействие иммунной системы организма животного и вакцинации. Существует предположение, что характер эпизоотической ситуации и патогенез болезни во многом зависят от антигенной изменчивости вируса, обусловленной мутациями в составе протеинов, особенно G [48, 58, 59].

Содержание телят в индивидуальных клетках или домиках значительно снижает риск возникновения болезни, однако первичные и повторные вспышки болезни регистрируются и в хозяйствах с хорошими условиями содержания животных, что говорит о том, что квазидисперсные варианты вируса сохраняются у телят в каждом стаде, способствуя при определенных условиях возникновению другого типа вируса с более высокой вирулентностью [15, 17].

**Патогенез болезни** до конца не выяснен. Вирус является прямым респираторным патогеном и размножается только в органах респираторного тракта, включая ткань легких. Виремия при этой болезни отсутствует. Главными клетками-мишениями для него являются клетки реснитчатого эпителия и пневмоциты 2-го порядка, в которых он вызывает различные поражения, вплоть до некрозов [47, 58, 73].

Вирус обладает способностью «уклоняться» от воздействия иммунной системы организма животного и вызывать болезнь даже в присутствии специфических антител или после введения вакцин, что обусловлено иммунопатологическими механизмами [21, 22]. Доказательством вовлечения иммунной системы в патологические процессы при РСИ КРС служит то, что наиболее тяжелые симптомы болезни и повреждение ткани легких наблюдаются не в период размножения вируса в клетках респираторного

эпителия, а значительно позднее, уже после элиминации инфекционного агента из организма [15, 34, 37].

Вирус обладает мощным иммунодулирующим потенциалом. В зависимости от ситуации одни и те же иммунные механизмы, индуцированные вирусом, могут оказывать как защитное, так и патогенное действие. Несбалансированный иммунный ответ и развитие иммунопатологии при РСИ КРС связаны главным образом с белком G [37, 47, 48].

Агент может подавлять функциональную активность антигенпрезентирующих клеток и вирус-специфичных Т-лимфоцитов за счет гиперсекреции иммunoспрессорных факторов, прежде всего IL10. Иммunoспрессивное действие вируса связано с его устойчивостью к воздействию интерферона, что приводит к подавлению IFN  $\alpha/\beta$  (типа 1), и является функцией неструктурных белков NS1 и NS2. У инфицированных животных этот факт отрицательно влияет на выработку противовирусного иммунитета и активность фагоцитов в легких, способствуя возникновению бронхопневмонии. Циркулирующие лейкоциты телят обладают повышенной способностью к выработке провоспалительных цитокинов (IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  — фактор некроза опухолей). Этот эффект зависит от возраста животных: у молодых телят врожденные цитокиновые профили выше, чем у животных старших возрастов, что объясняет более тяжелое течение болезни в раннем возрасте [22, 29, 33, 71]. У инфицированных животных, как правило, регистрируют повышенный аллергический фон и аллергическое заболевание легких, что также можно объяснить функцией провоспалительных цитокинов. Этот эффект усиливает действие лейкотоксина *M. haemolytica* за счет подавления созревания дендритных клеток. В дополнение к этому вирус подавляет активность респираторного

эпителия, что приводит к повышению уровня экспрессии молекул, используемых бактериями в качестве рецепторов [34, 39, 55, 60].

Инфекция вирусом значительно понижает адгезию бактерии *Pasteurella multocida* к эпителиальным клеткам верхних дыхательных путей за счет подавления экспрессии молекул межклеточной адгезии. Это позволяет бактериям проникать в нижние дыхательные пути и вызывать тяжелые пневмонии. При нормальном функционировании неспецифической иммунной защиты верхних дыхательных путей эти клетки могут захватывать бактерию, но инфекция вирусом нарушает эту функцию [63, 64].

Вирус оказывает на иммунную систему двоякое действие. Тяжелое течение инфекции может быть связано не с пониженным уровнем врожденного или приобретенного иммунитета, а, напротив, с его гиперактивностью. Поэтому разрушение легочной ткани (в т.ч. неинфицированной) при тяжелом течении инфекции не связано с прямым цитопатогенным действием вируса, а является следствием избыточной активности клеток воспаления (BRSV-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов) [15, 34, 37].

Важным иммунопатологическим аспектом патогенеза инфекции является выработка антител к протеину F, обладающих слабой нейтрализующей активностью, высокие концентрации IgE в крови и носоглоточных смыках, а также высокий уровень гистамина в носовых сокретах. Существует корреляция между тяжестью проявления клинических признаков болезни и наличием IgE и интерлейкина-4 не только в сыворотке крови, но также в лимфе и ткани легких [34, 37, 51].

У больных животных преобладает Т-хелперный иммунный ответ и происходит выработка интерлейкина-4 лим-

фоцитами, что свидетельствует о Th2 модуляции иммунного ответа.

Разрушение легочной ткани вследствие воспалительных процессов способствует диссеминации патогена. Кроме того, осложнение инфекционного процесса связано с искажением баланса регуляторных иммунных механизмов. По современным представлениям, течение инфекции и характер иммунного ответа на нее во многом определяются типом цитокиновой регуляции. При 1-м типе ответа (обозначаемом условно как Th1-тип, поскольку ключевыми регуляторами при этом являются CD4+ Т лимфоциты-хелперы 1-го типа, Th1) стимулируется синтез IFN, IL 2 и IL12. При другом типе ответа, индуцируемом главным образом CD4+ Т хеллерами 2-го типа (Th2), активируется синтез IL 4, IL 5, IL 6, IL 10 и IL 13 [34, 37, 43, 50].

Для неосложненного течения болезни характерно превалирование Th1-опосредованного иммунного ответа, при котором активируются вирус-специфичные CD4+ Th1 и цитотоксические Т лимфоциты, синтезируются IFN, TNF $\alpha$ , IL 2. Такой тип воспаления является защитным и приводит к быстрому выздоровлению животного [15].

Осложненное течение инфекции связано с активацией Th2-зависимых процессов, что влечет за собой патологические проявления (бронхиальную гиперреактивность и обструкцию дыхательных путей), развивающиеся в результате чрезмерной активности Th2-опосредованных цитокинов (IL 4, IL 5, IL 10, IL 11 и IL 13) [34, 37].

Дисбаланс иммунного противовирусного ответа и сдвиг его в сторону Th2-реакций служат одной из причин того, что телята первых месяцев жизни составляют группу повышенного риска в отношении тяжелого течения болезни и ее отдаленных последствий. Возрастная дифференциация объясняется

своебразием нормального иммунного статуса новорожденных: повышенной секрецией Th2-опосредованных цитокинов [34, 47].

В редких случаях вирус выступает в качестве аллергена и вызывает образование большого числа эозинофилов. В норме эти клетки играют защитную роль. Избыточная активность эозинофилов может вызвать повреждение нормальной легочной ткани и формирование бронхоспазма. Показателем аллергического воспаления при РСИ КРС также является повышенный синтез гистамина и производных арахидоновой кислоты — цистеинил-лейкотриенов. Эти медиаторы служат мощными констрикторами гладкой мускулатуры респираторного тракта, секретируются тучными клетками и базофилами при их активации иммунными комплексами (аллерген-IgE) и вызывают обструкцию бронхов [34, 47].

**Клинические признаки болезни.** Клинические признаки часто наблюдаются через 7–10 дней после воздействия стресса на организм животного, иногда через 30 дней. Инкубационный период составляет 2–5 дней. Вирус выделяется с носовыми секретами в течение 2–6 дней после заражения, а антиген вируса присутствует в нижних отделах легких 2–11 дней. Условно-патогенные бактерии (*M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somni*) или *M. bovis* часто осложняют течение инфекции, и несмотря на то что вирус в некоторых случаях может быть единственным этиологическим агентом болезни, результаты патологоанатомического вскрытия, проведенного на более поздних стадиях инфекции, а также лабораторные исследования могут выявить только бактериальные агенты. Это связано с тем, что сроки обнаружения вируса ограничены несколькими днями, указывая на «транзитную» природу инфекции [47, 58, 73].

Различают три формы болезни: субклиническую, острую и сверхострую [3, 20, 23, 45, 47, 58, 68, 73].

При субклинической форме признаки болезни варьируют от транзитной лихорадки до одышки. При таком течении возникают поражения органов верхнего либо одновременно верхнего и нижнего отделов респираторного тракта. Поражение верхних дыхательных путей сопровождается кашлем с серозно-слизистыми выделениями из носа и глаз. Регистрируют брюшной тип дыхания, повышение температуры тела и выделение обильной слюны из ротовой полости. Выздоровление наступает в течение недели. Переболевшие животные отстают в росте, не дают привесов [58].

При острой форме регистрируют одышку, обусловленную разрушением паренхимы легких, приводящим к кислородному голоданию, цианозу и летальному исходу. Гибель животных может наступить в течение нескольких дней, несмотря на проводимое лечение.

При сверхострой форме отмечают угнетение животных, отказ от корма, снижение молочной продуктивности у лактирующих коров, повышение температуры тела, учащение и брюшной тип дыхания. Животные дышат открытым ртом с высунутым языком, шея и голова опущены вниз, из ротовой полости выделяется обильная слюна. В таких случаях у них регистрируют легочную (альвеолярную, бронхиальную) эмфизему, интерстициальную пневмонию и отек легких. Может развиваться подкожная эмфизема [58].

Тяжесть поражений легких, в том числе и эмфизема, часто не коррелируют с первичной вирусной инфекцией, количеством вируса и распространением его в ткани легких, а являются результатом реакции организма животного [34, 37].



Рис. 3. Клинические признаки респираторно-синцитиальной инфекции у теленка 4 мес. черно-пестрой породы (фото Глотова А.Г.)



Рис. 6. Легочная эмфизема  
(фото Глотова А.Г.)



Рис. 4. Клинические признаки респираторно-синцитиальной инфекции у теленка 6 мес. симментальской породы (фото Глотова А.Г.)



Рис. 7. Разрушение паренхимы легких  
(фото Глотова А.Г.)



Рис. 5. Клинические признаки респираторно-синцитиальной инфекции у коровы  
(фото Глотова А.Г.)



Рис. 8. Геморрагическое воспаление  
легочного средостенного лимфатического  
узла (фото Глотова А.Г.)



Рис. 9. Острая фибринозная пневмония у теленка 4 мес., вызванная BRSV и бактериями *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (фото Глотова А.Г.)



Рис. 10. Острая фибринозная пневмония у коровы, вызванная BRSV и бактериями *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (фото Глотова А.Г.)

**Патологоанатомические изменения** регистрируют только в легких [25, 26, 47, 73]. На вскрытии трупов павших или вынужденно убитых животных выявляют признаки интерстициальной пневмонии, уплотнение и воспаление краиновентральных частей легких, имеющих выраженный красно-фиолетовый цвет, которые при пальпации эластичны. В области больших и малых бронхов регистрируют слизисто-гнойный экссудат. Каудодорсальные части легких могут не разрушаться и вследствие эмфиземы выглядят бледными и увеличенными

в объеме. В них можно увидеть междольковые, дольковые (lobularные) и субплевральные эмфизематозные поражения, приводящие к пневмотораксу, пневмомедиастинуму (спонтанной эмфиземе средостения) или пневмоперикарду (скопление воздуха в полости перикарда). Легкие увеличены в размере. Иногда регистрируют «ломкость» легочной ткани. Трахеобронхиальные и средостенные лимфатические узлы увеличены и отечны, иногда геморрагически воспалены. В некоторых случаях регистрируют подкожную эмфизему в области лопаток, спины, шеи или промежности. В случае бактериальной суперинфекции паренхима легких раздувается сильнее, происходит обильный выпот фибрина и может возникать фибринозная бронхопневмония при осложнении бактериями семейства *Pasteurellaceae*.

**Гистологические изменения.** В краиновентральных долях легких регистрируют некротический бронхиолит, синцитии, гиперплазию пневмоцитов второго порядка и экссудативный или пролиферативный альвеолит. Альвеолы заполнены воздухом и расширены. Частый признак — некротический бронхиолит, характеризующийся дегенеративным или некротическим поражением реснитчатого или бронхиолярного эпителия [25, 26].

Некроз эпителиальных клеток приводит к образованию язвенных очагов и эрозий, покрытых обломками некротических клеток, с соседними вырожденными клетками, имеющими округленные границы. Многоядерные синцитиальные клетки часто выступают из бронхиолярной стенки или находятся в ее просвете. Синцитиальные клетки также обнаруживаются в альвеолах. В бронхах, бронхиолах и альвеолах регистрируют нейтрофильные экссудаты [58].

Наблюдают дольковое или интерстициальное утолщение альвеолярных

перегородок, которое является результатом скопления альвеолярного капилляра, инфильтрации воспалительных клеток (т.е. лимфоцитов, макрофагов) и гиперплазии пневмоцитов II типа. Междольковые перегородки расширены в результате отека и расширения лимфатических сосудов.

Трахеобронхиальные лимфатические узлы характеризуются увеличенными корковыми слоями с выраженным фолликулами и расширенными парафолликулярными областями и медуллярными шнурами из-за лимфоцитарной гиперплазии. Медуллярные пазухи содержат макрофаги с различным количеством лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов, содержащих гемосидерин, а иногда нейтрофилы и эозинофилы. При вторичных бактериальных инфекциях изменения в трахеобронхиальных лимфатических узлах имеют дополнительные гистологические особенности, варьирующие от гнойных до лимфоцитарных и гранулематозных [47, 58].

**Диагностика.** Диагноз на РСИ КРС ставится на основании эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических изменений с обязательным лабораторным подтверждением. Лабораторная диагностика РСИ включает выделение и идентификацию возбудителя в чувствительной культуре клеток, обнаружение антигена или нуклеиновой кислоты вируса в пробах биологического материала от больных животных в реакции иммунофлуоресценции (РИФ), методом иммуногистохимии и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), а также установление сероконверсии к вирусу у переболевших животных.

Материалом для исследований служат тампонные пробы носовых и глазных выделений, трахеальный и бронхиальный экссудаты, легких и бронхов.

**Выделение вируса в культурах клеток.** Результат выделения вируса в культурах

клеток во многом зависит от правильно отбора, хранения и транспортировки проб биоматериала. Выделение и культивирование вируса затруднено ввиду его чрезвычайной лабильности. Изолировать его от больных животных можно только на ранней стадии инфекции, и вероятность выделения снижается с появлением клинических признаков заболевания. Из проб носовых выделений, трахеального и бронхиального экссудата, легких и бронхов вирус можно выделить только на 2–11-й день после инфицирования животных. Выделение возбудителя возможно только из свежего материала, а также хранившегося 3–5 ч. при +4°C или быстрозамороженного и хранившегося при –70°C.

Выделение вируса проводят в первично-трипсинизированных культурах клеток эмбриона коровы (ПЭК, ЛЭК) или testicул бычков (ТБ). Культуры клеток овечьего происхождения (FLK, почки и testicулы ягнят) также обладают чувствительностью к нему.

В связи с низкой эффективностью вирусологического метода используют методы прямого обнаружения антигенов вируса или его РНК.

**Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)** используется для выявления идентификации антигена вируса в пробах легких. К недостаткам метода относятся затруднения при оценке результатов, связанные с одинаковой окраской фоновых тканей и клеточных включений вируса.

**Метод иммуногистохимии (ИГХ).** Для исследований можно использовать образцы тканей, фиксированные формалином. Имеет преимущество перед РИФ, так как позволяет более точно оценивать клеточные структуры и повреждения. На эффективность РИФ и метода ИГХ отрицательное влияние оказывает аутолиз тканей [77].

**ПЦР.** Дополнительным методом является полимеразная цепная реакция с

обратной транскрипцией, позволяющая определить наличие генома вируса [4, 6, 14, 58–59]. ПЦР в режиме реального времени во многих лабораториях становится основным методом диагностики, так как является более простым и более чувствительным, чем РИФ [24]. Специфичность многих наборов приближается к 99,35%, а предел выявления вируса составляет 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл [66, 70]. Учитывая полиэтиологическую структуру респираторных болезней, предпочтение отдается мультиплексным вариантам диагностических тест-систем. В некоторых случаях при помощи ОТ-ПЦР можно выявить вирус после интраназальной вакцинации телят в течение 14 дней [58].

**Серологическая диагностика.** Для установления ретроспективного диагноза острой инфекции необходимо продемонстрировать сероконверсию, т.е. диагностический (4 и более кратный) прирост титров специфических антител к вирусу при исследовании парных проб сыворотки крови, отобранных от больных и переболевших животных в начальной стадии заболевания и через 21–30 дней.

В связи с частым присутствием колостральных антител серологический метод бывает неэффективным у животных до 1–3-месячного возраста, поэтому рекомендуется использовать его для исследования проб от животных старших возрастов. Недостатком этого метода является длительный период между началом вспышки и окончательным диагностическим заключением.

Для выявления антител и ретроспективной диагностики РСИ используется метод ИФА/ELISA, направленный на выявление изотипов иммуноглобулинов [17, 58]. Считается, что выявление специфических антител является методом диагностики прошедшей инфекции, пассивной иммунизации или вакцинации, а кинетика изотипов иммуногло-

булинов у животных, не подвергавшихся иммунизации, может служить признаком текущей инфекции. Кинетика иммуноглобулинов варьирует в соответствии с чувствительностью использованных методов для выявления специфических иммуноглобулинов [58]. В связи с трудностями поддержания и культивирования вируса реакция нейтрализации в ветеринарной диагностической практике применяется реже. В РФ широкое распространение получила реакция непрямой гемагглютинации [1].

**Дифференциальная диагностика.** При проявлении клинических признаков респираторной болезни у животных необходимо исключить инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3, вирусную диарею — болезнь слизистых оболочек, адено-вирусную инфекцию, а также инфекции, вызванные бактериями родов *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Salmonella*, *Mycoplasma* и *Histophilus somni*.

У взрослых животных необходимо исключить атипичную пневмонию (АП) крупного рогатого скота и клостридиозы, причиной которых являются нарушения в кормлении коров, приводящие к возникновению ацидозов и кетозов, поражению печени и выработке токсичных, отрицательно влияющих на паренхиму легких, вызывая эмфизему. Атипичной пневмонией болеют только дойные коровы (25).

При РСИ КРС заболеваемость высокая, но летальность в неосложненных случаях низкая, а при атипичной пневмонии показатели заболеваемости варьируют и зависят от уровня воздействия кормового фактора, но летальность всегда высокая и может достигать 100%.

**Вакцинация.** В связи с широким распространением инфекции и роли возбудителя в этиологии респираторных болезней крупного рогатого скота существует потребность в эффективных вакцинах и оптимальных схемах их

применения. Вакцинация против респираторно-синцитиальной инфекции представляет определенную проблему. Это связано с иммунопатологическими состояниями, вызываемыми вакцинами в организме привитых животных, аналогичными при естественной инфекции, а также с некоторыми трудностями получения, культивирования, аттенуации вакциновых штаммов и технологиями их инактивации. Целью разработки вакцин является то, что любая из них не должна имитировать иммунный ответ организма на естественную инфекцию вирусом, он должен формироваться иным путем и быть более эффективным [34, 37].

В настоящее время вакцинация против данной болезни проводится во всех странах с развитым животноводством и является важным компонентом противоэпизоотических мероприятий. Однако при данной болезни она служит лишь дополнительной мерой, которая осуществляется в комплексе с общехозяйственными мероприятиями. В крупных молочных и мясных хозяйствах необходимо проводить плановую иммунизацию телят против РСИ крупного рогатого скота с учетом возрастной восприимчивости животных и точного знания эпизоотической ситуации.

Вакцинация должна блокировать инфекцию клеток-мишеней респираторной системы с целью защиты животных от инфицирования и снижать степень распространения вируса среди восприимчивого поголовья. Кроме этого, вакцины должны индуцировать выработку протективного иммунного ответа в присутствии колостральных антител, обладать перекрестной защитой с учетом антигенных подгрупп вируса и не обладать способностью усиления болезни за счет иммунопатологических механизмов. Дополнительной целью является снижение риска возникновения и тяжести

течения смешанных респираторных болезней («респираторного комплекса» и вторичного пастереллеза крупного рогатого скота). Своевременно иммунизированные телята легче переносят инфекцию и реже заболевают бактериальными бронхопневмониями.

Попытки специфической профилактики инфекции человека начались с использования вакцины, инактивированной формалином, в середине шестидесятых годов прошлого столетия. Она не только не смогла предотвратить заболевание, но вызвала усиленный иммунный ответ организма и тяжелые клинические признаки болезни у иммунизированных детей при контакте с вирусом во время следующего эпидемического сезона с летальным исходом части привитых. Введение вакцины сопровождалось иммунопатологическими процессами в организме детей, аналогичными таковым при естественной инфекции [44].

Был сделан вывод, что такой парадоксальный эффект иммунизации связан с образованием антител к белку F вируса. В организме детей вырабатывался IgG, не обладавший вируснейтрализующей активностью. Кроме того, у них выявили повышенные уровни вирусоспецифических IgE и гистамина в носоглотке. Позднее установили, что в процессе инактивации произошла отрицательная модификация некоторых эпитопов на поверхности белков F и G, являющихся ключевыми для стимуляции гуморального иммунного ответа, в частности для выработки вируснейтрализующих антител [34, 37, 47]. Таким образом, было показано, что классические вакцины, инактивированные формалином, не только не обеспечивают адекватной защиты животных, но и приводят к усилению клинических признаков после заражения патогенным штаммом вируса. Иммунизация такими препаратами стимулирует в основном выработку Th2

(клеточного) аллергического иммунного ответа, характеризующегося большим количеством эозинофилов в бронхоальвеолярной жидкости и тканях легких, а также высоким уровнем иммуноглобулина Е в сыворотке крови животных и гистамина [34, 37, 47].

В дальнейшем аналогичный эффект вакцинации наблюдали и у телят, у которых в дополнение к перечисленным симптомам регистрировали понижение уровня интерферона в сравнении с невакцинированными особями [34, 37]. В некоторых работах описывался отрицательный эффект убитых и живых вакцин. В последнем случае осложнения наблюдали у телят, иммунизированных в период циркуляции эпизоотического штамма вируса в стаде [33, 38, 43, 75]. В этих опытах привитые телята болели сильнее, чем не получавшие вакцины.

За последние десятилетия знания о сложных взаимоотношениях вируса и организма животного значительно расширились. Наблюдения, сделанные в естественных условиях и на лабораторных моделях, позволили понять, что не вирусная инфекция, а реакция организма животного на внедрение вируса вызывает наиболее тяжелую патологию и клинические признаки болезни. Было установлено, что при этой инфекции большую роль играет начальный цитокиновый иммунный ответ. В отличие от большинства известных вирусов, вызывающих сильный цитотоксический Т-клеточный ответ, BRSV модифицирует иммунную систему организма в сторону иммунного ответа типа Th2, являющегося более «мягким» в отношении вируса, но стимулирующим нежелательные аутоиммунные воспалительные реакции в тканях инфицированных легких животного. В связи с этим подходы к разработке вакцинальных препаратов были изменены и в настоящее время используются новые методы

их получения, введения и иммуномодуляции [25, 29, 31, 34, 40].

На мировом рынке присутствуют несколько типов цельновирионных вакцин, в большинстве которых вирус является одним из компонентов поливалентных препаратов. В данной ситуации достаточно трудно оценить эффект отдельного компонента [67]. В основном все вакцины рассчитаны на снижение тяжести течения смешанных респираторных болезней крупного рогатого скота и профилактику инцидентности «вторичного» пастереллеза, где их эффективность довольно высока. Общепринятым методом иммунизации животных является парентеральный, хотя вакцины для интраназального применения показывают более высокий профилактический эффект [29].

**Живые вакцины для парентерального введения.** Живые вакцины против РСИ КРС впервые стали доступны в Европе в 1978 г., а с 1980 г. — в США. Эти вакцины индуцируют выработку лимфокинов (IL-2 и IFN-g) и IgG. Титры вируснейтрализующих антител у животных после введения живых вакцин выше в сравнении с инактивированными препаратами. Кроме этого, они индуцируют выработку антител, блокирующих протеин F, и клеточный иммунитет [29, 30]. Показано также, что соотношение вируснейтрализующих антител с измененными вирусспецифическими IgG-антителами у телят, иммунизированных живыми вакцинами, выше, чем у телят, привитых инактивированным препаратом [25, 29]. Живые вакцины, как правило, используются в неблагополучных хозяйствах с целью подавления или снижения уровня циркуляции вируса в стаде.

**Живые вакцины для интраназального введения** стали коммерчески доступными практически одновременно в Европе и Северной Америке в 2007 году. Их использование регламентируется воз-

можностью ранней защиты телят от инфицирования на фоне колострального иммунитета. При РСИ КРС нет стадии виреемии и циркулирующие специфические антитела не могут блокировать прямой респираторный патоген, поэтому обычные вакцины для парентерального введения имеют относительно низкую эффективность. Преимуществом в данном случае обладают живые вакцины для интраназального применения.

Аттенуированные штаммы, введенные интраназально, реплицируются на слизистой оболочке носа и миндалин и стимулируют иммунную систему слизистых оболочек к выработке секреторного иммунитета, который не интерферирует с системным. Поствакцинальный секреторный иммунитет снижает тяжесть клинических признаков болезни и способен профилактировать заражение вирусами. Как правило, после интраназальной иммунизации титры специфических антител к вирусу у телят в сыворотке крови низкие либо не выявляются вообще, что затрудняет оценку напряженности поствакцинального иммунитета по результатам серологических исследований [23, 29]. Несмотря на это, а также на отсутствие сероконверсии к вирусу в течение нескольких месяцев, эти вакцины обладают выраженным защитным эффектом и значительно снижают уровень заболеваемости и падежа телят, особенно при их переводе из родильного отделения в профилакторий или в период комплектования сборных групп в возрасте 2–4 месяцев [9].

**Инактивированные вакцины.** Используются для профилактики болезни. Впервые появились на рынке в начале 1980-х годов в Европе. По сравнению с живыми вакцинами они формируют короткий и более слабый иммунитет, поэтому требуют повторных введений. Поствакцинальный иммунитет форми-

руется в течение нескольких недель, в то время как живые вакцины могут обеспечивать защиту в течение нескольких дней [25, 29, 46]. У животных, иммунизированных инактивированными вакцинами, как правило, титры вируснейтрализующих антител ниже, чем титры IgG. Для повышения эффективности инактивированных вакцин и стимуляции более высоких уровней вируснейтрализующих антител, а также индукции Th1-лимфоцитов вместо Th2-типа используют различные адьюванты [76]. Однако риск отрицательной модификации иммунодоминантных эпитопов сохраняется до сих пор, поэтому состав инактивированных вакцин играет большую роль при профилактике тяжелых форм инфекции [25]. В связи с этим вакцины, инактивированные формалином или другими способами, по-прежнему считаются потенциально опасными с точки зрения выработки непротективного иммунного ответа Th2 и стимуляции иммунопатогенных механизмов.

**Субъединичные вакцины.** Считается, что они лишены недостатка усиления иммунного ответа. Находятся на стадии разработки и изучения эффективности. В качестве кандидатного был предложен, в частности, мутантный вирус с делециями белков NS1 и NS2 [71]. Вакцины, содержащие ДНК, кодирующую белки F или N, вызвали выработку специфического IgA. Вакцина, содержащая плазмиды со вставками этих белков, индуцировала высокий уровень клеточно-опосредованного иммунитета у телят с высокими титрами колостральных антител. Несмотря на то, что этих показателей недостаточно для обеспечения полной защиты от клинического заболевания телят, вакцины имеют перспективы с использованием инактивированного усилителя [56].

Субъединичная вакцина на основе наночастиц нуклеопротеина обеспечила

частичную клиническую защиту от заражения вирусом. В ответ на ее введение у животных происходила выработка анти-N-антител в носовых сокретах и N-специфического клеточного иммунитета в локальных лимфатических узлах [71]. Привитые телята легче переносили контрольное заражение в сравнении с невакцинированными, у которых регистрировали признаки умеренной респираторной болезни с очагами уплотнения в легочной ткани. Титры вируса, выделяемого с носовыми сокретами, были ниже у привитых животных [29, 71].

Вакцинация рекомбинантным вирусом коровьей оспы, экспрессирующими различные белки вируса, привела к выработке вируснейтрализующих антител к белку F в более высоких титрах, чем к белку G. В легких выявляли местные антитела (IgG1 и IgA) к белку F. Вируснейтрализующие антитела у телят, вакцинированных N-белком, не выявлялись [29, 79].

**Интерференция колострального и активного иммунитета.** Наличие колострального иммунитета у телят — главное препятствие для формирования активного поствакцинального иммунитета [8, 9, 47, 56, 76]. На фоне высоких титров колостральных антител снижается эффективность вакцинации. Эта проблема была выявлена у всех вирусов «респираторного комплекса», включая респираторно-синцитиальный. В отношении защитной роли колостральных антител при РСИ КРС существуют противоречивые мнения. Возможно, что колостральные антитела, представленные в основном изотипом IgG1, обеспечивают только частичную защиту телят от заражения вирусом, однако их присутствие необходимо учитывать при планировании программ вакцинации стада.

В настоящий момент временные рамки для парентерального введения вакцин устанавливаются в период, когда титры

колостральных антител снижаются до уровня, блокирующего выработку поствакцинального иммунитета, но недостаточно высокого для предотвращения инфицирования телят эпизоотическими штаммами, что создает временное окно для заражения животного. Период между снижением защитного уровня материнских антител и началом формирования собственного иммунного ответа на вакцины называется «окно восприимчивости», которое может находиться в возрасте от нескольких недель до нескольких месяцев [8, 9, 29, 31].

Теоретически оптимальным возрастом для введения вакцин является 3–4 месяца, однако на практике ситуация иная. Титры колостральных антител к вирусам у телят снижаются до максимально низкого уровня или исчезают в разные сроки (10–15; 30–40; 60 дней и т.д.) в зависимости от конкретных условий фермы. В некоторых случаях материнские антитела у телят отсутствуют полностью. Именно в эти периоды возникают вспышки массовых респираторных болезней, поэтому время вакцинации необходимо выбирать в каждом конкретном случае с учетом эпизоотической ситуации и сроков снижения титров антител. В связи с этим актуальным является выбор сроков первичного введения вакцин телятам.

**Особенности вакцинации против респираторно-синцитиальной инфекции КРС.** Для получения положительного эффекта от вакцинации с учетом отрицательного влияния колострального иммунитета необходим постоянный серологический мониторинг для установления времени снижения титров колостральных антител. Как правило, в этот период происходит заражение телят полевым вирусом, что делает вакцинацию практически бесполезной. Поэтому в практических условиях надо иммунизировать животных до их инфицирования. Большое значение в этом случае имеет

первичная интраназальная вакцинация, в том числе на фоне колостральных антител в первые дни жизни, и парентеральная ревакцинация, сроки которой определяют при серологическом исследовании группы животных.

Эффект такой иммунизации объясняется тем, что колостральные антитела практически не попадают на слизистые оболочки верхнего отдела респираторного тракта и не могут влиять на формирование местного постvakцинального иммунитета, то есть она не только защищает телят от инфицирования, но и снижает степень распространения вируса в группе животных [8, 9, 29]. Данный метод как элемент ранней защиты молодняка в неблагополучных по респираторным болезням хозяйствах показал хорошие результаты при недополучении телятами иммунного молозива либо при выпойке им неиммунного молозива от серонегативных матерей [8, 9].

Поэтому сочетание первичной интраназальной одно- или двукратной (по показаниям) иммунизации 1–3-дневных телят с парентеральной двукратной ревакцинацией, сроки которой подбираются по результатам серологических исследований в конкретном хозяйстве (обычно в возрасте 30–35 и 60–65 дней), будет оптимальным. Последующую вакцинацию проводят с целью повышения уровня популяционного иммунитета в возрасте 6 месяцев. Обязательно прививают коров дойного стада и коров и нетелей в запуске для создания и поддержания высокого уровня колострального иммунитета у телят.

При активной циркуляции вируса в стаде титры специфических антител у взрослых животных высокие, поэтому может потребоваться ежегодная плановая бустерная (усиливающая) иммунизация маточного поголовья для поддержания высокого уровня популяционного иммунитета. В стадах с давней

историей инфицирования, как правило, титры антител у взрослых животных низкие, что обуславливает низкий уровень колострального иммунитета у телят, поэтому необходима дополнительная иммунизация коров и нетелей в запуске для поднятия титров антител и передачи их потомству.

Необходимо помнить, что главная цель вакцинации — снижение риска возникновения смешанных вирусных инфекций и вторичного пастереллеза у животных при помощи систематической вакцинации. Необходимо учитывать полиэтиологичность респираторных болезней и спектр других вирусов, участвующих в этиологии «респираторного комплекса», и подбирать сроки первого введения вакцин в более раннем возрасте. Вне зависимости от типа выбранной вакцины нужно учитывать наличие циркуляции РСВ в стаде, а также других возбудителей вирусных инфекций и планировать долгосрочную программу вакцинации с учетом всех половозрастных групп, восприимчивых к инфицированию.

При планировании программ вакцинации требуется оценка степени риска возникновения инфекции в конкретном хозяйстве. Необходимо провести первичные скрининговые серологические исследования для ретроспективной диагностики и оценки степени распространения вируса среди животных и выявления сероконверсии к нему. При массовых вспышках респираторных болезней следует изучить их этиологическую структуру и определить роль каждого возбудителя в этиологии «смешанных» болезней при помощи вирусологических (молекулярных) и бактериологических исследований.

Особенности содержания животных также имеют большое значение. В молочных хозяйствах ранняя изоляция телят, хорошие условия индивидуального

содержания и кормления могут обеспечить более напряженный и длительный колостральный иммунитет и способствовать формированию более длинного «окна» перед вакцинацией. В идеале, учитывая значительную антигенную нагрузку на молодняк, сроки первой парентеральной иммунизации можно сдвигать в сторону более поздних возрастов, например 2–3 мес.

Вакцинация является единственным специфическим методом профилактики и контроля вирусных инфекций крупного рогатого скота. Выбор вакцин зависит от особенностей эпизоотической ситуации в конкретном хозяйстве, поэтому схемы иммунизации, по всей вероятности, будут несколько различаться и не могут быть универсальными для всех хозяйств.

Планирование специальных мероприятий (в виде долгосрочных программ) зависит от типа ведения животноводства, концентрации животных, молочной продуктивности, частоты ввода ремонтных телок и животных из других источников, а также затрат и прибыли. Важно учитывать наличие сопутствующих инфекций, вызывающих патологию респираторной системы, а также многочисленные факторы незаразной этиологии, способствующие возникновению пневмоний: нарушение обмена веществ, недостаток витаминов, минеральных веществ, уровень кормления, система получения и выращивания телят и другие. Схема вакцинации должна быть оптимальной и не перегружать организм животного избыточным количеством антигенов и частыми повторными введениями препаратов.

## Литература

1. Васильев А.В., Осидзе Н.Г., Сюрин В.Н. и др. РНГА в серодиагностике респираторно-синцитиальной инфекции

крупного рогатого скота. Ветеринария. 1988; 10: 33–34.

2. Глотов А.Г., Петрова О.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Татарчук А.Т., Котенева С.В., и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. Ветеринария. 2002; 3: 17–21.

3. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота. Ветеринария. 2009; 11: 18–23.

4. Глотова Т.И., Кунгурцева О.В., Глотов А.Г. и др. Выделение и типирование респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота при помощи ОТ-ПЦР. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2010; 10: 59–64.

5. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В., Нефедченко А.В., Войтова К.В. Особенности эпизоотической ситуации по респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах по производству молока. Ветеринария. 2010; 7: 21–25.

6. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Строганова И.Я. Выявление респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота при помощи ОТ-ПЦР. Вопросы вирусологии. 2011; 5(56): 34–37.

7. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Войтова К.В. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах. Ветеринария. 2014; 4: 7–11.

8. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А. Длительность и напряженность пассивного и приобретенного иммунитета к респираторным вирусам у крупного рогатого скота на молочных комплексах. Ветеринария. 2019; 1: 3–9.

9. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Влияние колострального иммунитета на эффективность вакцинации телят против вирусных инфекций (обзор литературы). Ветеринария. 2019; 6: 3–11.

10. Гуненков В.В., Халенев Г.А., Сюрин В.Н. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция. М.: Животноводство и ветеринария. 1975; 8: 70–76.
11. Журавлева Е.А. Нозоареал респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. Ветеринария. 2018; 12: 3–8.
12. Забережный А.Д. Получение рекомбинантных вирусов классической чумы свиней и респираторно-синцитиального вируса человека на основе инфекционных копий их геномов. Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2003; 256.
13. Кирпиченко В.В., Кононова С.В., Кононов А.В. и др. Культуральные свойства вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «АБ 1908». Ветеринария сегодня. 2019; 4: 31–36.
14. Котенева С.В., Войтова К.В., Глотова Т.И., Строганова И.Я., Глотов А.Г. Частота выявления генома респираторно-синцитиального вируса у крупного рогатого скота при вспышках бронхопневмоний на молочных комплексах. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2016; 3: 18–21.
15. Кривицкая В.З. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция, особенности патогенеза, стратегия профилактики и лечения. Вопросы современной педиатрии. 2013; 2(12): 35–43.
16. Крюков Н.Н., Зудилина З.Ф., Евдокимов С.И. Вирусные респираторные болезни крупного рогатого скота. Ветеринария. 1976; 6: 111–13.
17. Матвеева И.Н., Кошиш И.И., Кошиш Т.Ю. и др. Получение антигена респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота для использования в ИФА. Ветеринария. 2007; 11: 49–51.
18. Altamirano-Lagos M.J., Diaz F.E., Mansilla M.A. et al. Current Animal Models for Understanding the Pathology Caused by the Respiratory Syncytial Virus. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 873.
19. Agnes J.T., Zekarias B., Shao M. et al. Bovine respiratory syncytial virus and *Histophilus somni* interaction at the alveolar barrier. *Infection and Immunity*. 2013; 81: 2592–2597.
20. Andrews A.H., Blowey R., Boyd H., Eddy R. Respiratory disease // *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 2004.
21. Antonis A.F.G., Schrijver R.S., Daus F. et al. Vaccine-Induced Immunopathology during Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection: Exploring the Parameters of Pathogenesis. *Journal of Virology*. 2003; 77: 12067–12073.
22. Antonis A.F.G. Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence. *Journal of General Virology*. 2010; 91(10): 2497–2506.
23. Blödörn K., Hägglund S., Gavier-Widen D. et al. A bovine respiratory syncytial virus model with high clinical expression in calves with specific passive immunity. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11: 76.
24. Boxus M., Letellier C., Kerkhofs P. Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*. 2005; 125(2): 125–130.
25. Brodersen B.W. Bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2010; 26(2): 323–333.
26. Bryson D.G. Necropsy findings associated with BRSV pneumonia. *Vet. Med.* 1993; 88: 894–899.
27. Cirone F., Padalino B., Tullio D. et al. Prevalence of Pathogens Related to Bovine Respiratory Disease Before and After Transportation in Beef Steers: Preliminary Results. *Animals (Basel)*. 2019; 9(12): 1093.

28. Delabougline A., James A., Valarcher J.F. et al. Linking disease epidemiology and livestock productivity: The case of bovine respiratory disease in France. *PLoS One*. 2017; 12(12): e0189090.
29. Ellis J.A. How efficacious are vaccines against bovine respiratory syncytial virus in cattle? *Vet. Microbiol. Veterinary Microbiology*. 2017; 206: 59–68.
30. Ferella A., Aguirreburualde M.S.P., Sammarruco A. et al. Dynamics of neutralizing antibodies against Bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd from Santa Fe Province, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2020; S0325-7541(20)30027-4.
31. Fulton R.W., d'Offay J.M., Landis C. et al. Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine*. 2016; 34(30): 3478–3492.
32. Fulton R.W. Viruses in Bovine Respiratory Disease in North America: Knowledge Advances Using Genomic Testing. *Review. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2020; 36(2): 321–332.
33. Gershwin L.J., Gunther R.A., Horan W.J. et al. Effect of infection with bovine respiratory syncytial virus on pulmonary clearance of an inhaled antigen in calves. *Am. J. Vet. Res.* 2008; 69: 416–422.
34. Gershwin L.J. Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 35: 253–257.
35. Giannamarioli M., Mangili P., Nanni A. et al. Highly pathogenic Bovine Respiratory Syncytial virus variant in a dairy herd in Italy. *Vet. Med. Sci.* 2020; 00: 1–6.
36. Gorden P.J., Plummer P. Control, Management, and Prevention of Bovine Respiratory Disease in Dairy Calves and Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2010; 26(2): 243–259.
37. Guzman E., Taylor G. Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves. *Mol. Immunol.* 2015; 66(1): 48–56.
38. Hagglund S., Hu K., Vargmar K. et al. Bovine respiratory syncytial virus IS-COMs: immunity, protection and safety in young conventional calves. *Vaccine*. 2011; 29: 8719–8730.
39. Hagglund S. Epidemiology, Detection and Prevention of Respiratory Virus Infections in Swedish Cattle with Special Reference to Bovine Respiratory Syncytial Virus/Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Clinical Sciences Uppsala. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 2005.
40. Hagglund S., Blodorn K., Naslund K. et al. Proteome analysis of bronchoalveolar lavage from calves infected with bovine respiratory syncytial virus-Insights in pathogenesis and perspectives for new treatments. *PLoS ONE*. 2017; 12: e0186594.
41. Hoppe I.B.A.L., Medeiros A.S.R., Arns C.W., Samara S.I. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in non-vaccinated dairy cattle herds in Brazil. *BMC Vet. Res.* 2018; 14(1): 208.
42. International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV]. 2018. Megataxyony of negative-sense RNA viruses. Code assigned: 2017.006M [Accessed on 2019 Feb 28] [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20181649](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20181649).
43. Johnston D., Earley B., McCabe M.S. et al. Experimental challenge with bovine respiratory syncytial virus in dairy calves: bronchial lymph node transcriptome response. *Sci. Rep.* 2019; 9: 14736.
44. Kapikian A.Z., Mitchell R.H., Charnock R.M. et al. An Epidemiologic Study of Altered Clinical Reactivity to Respiratory Syncytial (RS) Virus Infection in Children Previously Vaccinated With An Inactivated RS Virus Vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 1969; 80: 405–421.
45. Klem T.B., Sjurseth S.K., Sviland S. et al. Bovine respiratory syncytial virus in experimentally exposed and rechallenged

- calves; viral shedding related to clinical signs and the potential for transmission. *BMC Vet. Res.* 2019; 15(1): 156.
46. Kolb E.A., Buterbaugh R.E., Rinehart C.L. et al. Protection against bovine respiratory syncytial virus in calves vaccinated with adjuvanted modified live vaccine administered in the face of maternal antibody. *Vaccine*. 2020; 38(2): 298–308.
  47. Larsen L.E. Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV): A review. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2000; 41(1): 1–24.
  48. Larsen L.E., Tjørnehoj K., Viuff B. Extensive Sequence Divergence among Bovine Respiratory Syncytial Viruses Isolated during Recurrent Outbreaks in Closed Herds. *J. of Clinical Microbiology*. 2000; 11: 4222–4277.
  49. Leme R.A., Dall Agnol A.M., Balbo L.C. et al. Molecular characterization of Brazilian wild-type strains of bovine respiratory syncytial virus reveals genetic diversity and a putative new subgroup of the virus. *Veterinary Quarterly*. 2020; 40(1): 83–96.
  50. McGill J.L., Sacco R.E.  $\gamma\delta$  T cells and the immune response to respiratory syncytial virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 181: 24–29.
  51. McLellan J.S., Yang Y., Graham B.S. et al. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. *J. Virol.* 2011; 85: 7788–7796.
  52. Meyer G., Deplanche M., Schelcher F. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31(2–3): 191–225.
  53. Murray G.M., More S.J., Clegg T.A. et al. Risk factors associated with exposure to bovine respiratory disease pathogens during the peri-weaning period in dairy bull calves. *BMC Veterinary Research*. 2018; 14: 53.
  54. Paccaud M.F., Jacquier C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 1970; 30: 327–342.
  55. Rice J.A., Carrasco-Medina L., Hodgins D.C., Shewen P.E. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 2007; 8(2): 117–128.
  56. Riffault S., Hägglund S., Guzman E. et al. A Single Shot Pre-fusion-Stabilized Bovine RSV F Vaccine is Safe and Effective in Newborn Calves with Maternally Derived Antibodies. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): E231.
  57. Rosenquist B.D. Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory disease. *J. Infect. Dis.* 1974; 130: 177–182.
  58. Sacco R.E., McGill J.L., Pillatzki A.E. et al. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Veterinary Pathology*. 2014; 51(2): 427–436.
  59. Sarmiento-Silva R.E., Nakamura-Lopez Y., Vaughan G. Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Viruses*. 2012; 4: 3452–3467.
  60. Singh K.J., Ritchey W., Confer A.W. *Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in bovine pneumonia. *Veterinary Pathology*. 2011; 48(2): 338–348.
  61. Schreiber P., Mattheise J.P., Dessy F. et al. High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health*. 2000; 47: 535–550.
  62. Spilki F.R., Almeida R.S., Domingues H.G. et al. Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. *Virus. Res.* 2006; 116: 30–37.
  63. Sudaryatma P.E., Nakamura K., Mekata H. et al. Bovine respiratory syncytial virus infection enhances *Pasteurella multocida* adherence on respiratory epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. 2018; 220: 33–38.

64. Sudaryatma P.E., Saito A., Mekata H. et al. Bovine Respiratory Syncytial Virus Decreased *Pasteurella multocida* Adherence by Downregulating the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on the Surface of Upper Respiratory Epithelial Cells. *Vet. Microbiol.* 2020; 246: 108748.
65. Taylor J.D., Fulton R.W., Lehenbauer T.W. et al. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can. Vet. J.* 2010; 51: 1095–1102.
66. Timsit E., Maingourd C., Le Dréan E. et al. Evaluation of a commercial real-time reverse transcription polymerase chain reaction kit for the diagnosis of Bovine respiratory syncytial virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010; 22(2): 238–241.
67. Tizioto P.C., Kim J., Seabury C.M. et al. Immunological Response to Single Pathogen Challenge with Agents of the Bovine Respiratory Disease Complex: An RNA-Sequence Analysis of the Bronchial Lymph Node Transcriptome. *PLoS ONE.* 2015; 10(6): e0131459.
68. Tjørnehøj K., Utenthal A., Viuff B. et al. An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves. *Research in Veterinary Science.* 2003; 74(1): 55–65.
69. Thomas L.H., Slott E.J., Collins A.P., Jebbett J. Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus. *British Journal of Experimental Pathology.* 1984; 65: 19–28.
70. Thonur L., Maley M., Gilray J. et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Veterinary Research.* 2012; 8: 37.
71. Valarcher J.F., Furze J., Wyld S. et al. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J. Virol.* 2003; 77: 8426–8439.
72. Valarcher J.R., Schelcher R., Bouhy H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virology.* 2000; 74(22): 10714–10728.
73. Valarcher J-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007; 38: 153–180.
74. Wellemans G., Leunen J., Luchsinger E. Respiratory ailments of cattle: isolation of a virus (220/69) with serologic resemblance to the human respiratory syncytial virus. *Ann. Med. Vet.* 1970; 114: 89–93.
75. Windeyer M.C., Leslie I.C.E., Godden S.M. et al. The effects of viral vaccination of dairy heifer calves on the incidence of respiratory disease, mortality, and growth. *J. Dairy Sci.* 2012; 95: 6731–6739.
76. Woolums A.R., Gunther R.A., McArthur-Vaughan K. et al. Cytotoxic T lymphocyte activity and cytokine expression in calves vaccinated with formalin-inactivated bovine respiratory syncytial virus prior to challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 27: 57–74.
77. Yaman T., Büyükbayram H., Özyıldız Z. et al. Detection of bovine respiratory syncytial virus, *Pasteurella multocida*, and *Mannheimia haemolytica* by immunohistochemical method in naturally-infected cattle. *Journal of Veterinary Research.* 2018; 62(4): 439–445.
78. Zhang M., Hill J.E., Fernando C. et al. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(3): 1379–1386.
79. Zhang M., Hill J.E., Godson D.L. et al. The pulmonary virome, bacteriological and histopathological findings in bovine respiratory disease from western Canada. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; 67(2): 924–934.

# ПАРАГРИП-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Верховская А.Е., Верховский О.А., Кис В.И., Алипер Т.И.

Парагрипп-3 крупного рогатого скота (ПГ-3 КРС, транспортная лихорадка КРС) — острая контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся поражением органов дыхания. В настоящее время болезнь распространена повсеместно.

**Этиология.** Впервые болезнь была описана в 1932 г. в США, при этом от больных телят выделили пастереллы, которые признали возбудителем транспортной лихорадки КРС. Однако в 1959 г. Рейзенгер и Хедделсон от телят с транспортной лихорадкой выделили и описали вирус парагриппа-3 (*bovine parainfluenza type-3 virus*) крупного рогатого скота [6, 15].

Вирус ПГ-3 относится к семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Paramyxovirinae*, роду *Respirovirus*. Геном вируса представлен односпиральной линейной молекулой минус-РНК. Вирион состоит из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки. Вирус быстро разрушается под действием высокой температуры, УФ-излучения, жирорастворителей (хлороформа, эфира), формалина, β-пропиолактона, низких значений pH [4].

Вирионы плеоморфны, 150–350 нм в диаметре, покрыты оболочкой с большими гликопротеидными шипами, 8–14 нм в длину. Вирусные структурные белки ПГ-3 либо связаны с липидной оболочкой, либо образуют комплекс с вирионной РНК. Фосфопротеин (P) и полимеразный (L) протеин связаны с вирусной РНК и формируют рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP), который в свою очередь окружен липопротеиновой оболочкой, состоящей из негликозилированного матричного (M) протеина и

двух гликопротеинов — белка слияния (F) и белка присоединения гемагглютинин-нейраминидазы (HN). Два этих белка формируют шипы на поверхности вириона и играют ключевую роль в патогенезе болезни. Белок HN отвечает за прикрепление вириона к клеточным рецепторам, в то время как белок F обеспечивает слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной. M протеин обеспечивает связь гликопротеинов вирусной оболочки с RNP-комплексом, обеспечивая стабильность вириона, и участвует в регулировании уровня синтеза вирусной РНК [9].

Вирус ПГ-3 КРС имеет 2 типа антигена: рибонуклеопротеидный (S-АГ) и поверхностный (V-АГ). Антигеннейштаммов вируса ПГ-3 не установлено. В разных странах все штаммы, выделенные от телят и взрослых животных, по антигенной структуре идентичны и соответствуют прототипному штамму SF-4, выделенному в США. Вирусы ПГ-3 КРС и человека антигенно сходны между собой. ПГ-3 КРС отличается от вируса ПГ-3 человека по белку HN, однако белок F ПГ-3 КРС имеет 80% гомологии с аналогичным белком вируса ПГ-3 человека [10, 17].

Вирус ПГ-3 обладает способностью к гемадсорбции и гемагглютинации. Эритроциты многих видов животных адсорбируются на клетках, инфицированных вирусом ПГ-3 КРС, а вирусная супензия агглютинирует эритроциты морской свинки, кролика, свиньи, обезьяны, коровы и других видов животных и не агглютинирует эритроциты лошади [4, 11, 20].

**Эпизоотологические данные.** Источником инфекции являются больные животные. Передача возбудителя происходит преимущественно воздушно-капельным путем, а также, возможно, пероральным и половым, т.к. вирус был выделен из молока, фекалий и вагинальных истечений [1, 2].

К вирусу чувствительны различные виды копытных, такие как крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, буйволы, верблюды, дикие жвачные, а также собаки, крысы и приматы. Для человека вирус ПГ-3 КРС не патогенен и практически не передается [9, 14].

У крупного рогатого скота чаще болеют телята в возрасте до года, заболеваемость может достигать 90–100%. Ввиду широкого распространения вируса ПГ-3 КРС среди овец рекомендуется регулярная вакцинация овец против ПГ-3 [4].

**Клинические признаки.** У телят, ягнят и козлят болезнь протекает преимущественно субклинически, в тяжелых случаях может наблюдаться лихорадка, слезотечение, серозные носовые выделения, депрессия, диспnoэ и кашель. У некоторых животных развивается интерстициальная бронхопневмония с преимущественным поражением центральных долей легких. При неосложненной инфекции вируса ПГ-3 КРС клиническая картина наблюдается в течение 3–4 дней и заканчивается полным выздоровлением [9].

После инфицирования вирусом ПГ-3 КРС телят-гнотобиотов инкубационный период составил 24–30 ч. У телят на 3–5-й день отмечалось повышение температуры до 41,5°C и появление серозных истечений из носа. У больных животных наблюдались угнетение, одышка, кашель, обильные серозно-слизистые, а затем гнойные истечения из глаз и носа, учащенное и поверхностное дыхание, легочные хрипы [6, 12].

Однако парагрипп-3 КРС редко протекает в виде моноинфекции. Вирус

ПГ-3 КРС вызывает местный иммуносупрессивный эффект, что ведет к развитию других вирусных и бактериальных инфекций, таким образом, вирус ПГ-3 КРС является важным этиологическим агентом энзоотической пневмонии телят [2, 8].

В стрессовых ситуациях, при транспортировке, некачественных условиях содержания болезнь часто осложняется другими вирусными инфекциями (адено-новирусной, коронавирусной, вирусной диареей, инфекционным ринотрахеитом, респираторно-синцитиальной), что ведет к развитию патологической микрофлоры, в первую очередь *Mannheimia haemolitica* и *Pasteurella multocida*. При этом у животных наблюдаются гнойные носовые истечения, кашель, одышка, анорексия, лихорадка, развивается тяжелая бронхопневмония, плеврит, энтерит, болезнь часто заканчивается летальным исходом [9, 14].

При хроническом течении болезни, характеризующимся развитием бронхопневмонии и интерстициальной пневмонии, кроме вируса ПГ-3 КРС и других вирусов, из тканей легких также выделяли еще один этиологический агент — *Mycoplasma bovis* [13].

У стельных коров в ряде случаев инфекция может привести к внутриутробному заражению плода, абортом или рождению нежизнеспособных телят [17, 18]. Однако исследования показали, что аборточное действие вируса ПГ-3 КРС не имеет существенного значения [5].

Большинство экспериментально инфицированных животных перестают выделять вирус с носовыми истечениями через 8–10 дней после заражения [12]. Однако полное прекращение выделения вируса не свидетельствует о полном освобождении организма от вируса. У естественно инфицированных животных вирус выделяется в течение нескольких месяцев [16]. Частота вспы-

шек ПГ-3 КРС указывает на возможную персистенцию вируса, отсутствие длительного иммунитета, постоянную реинфекцию и роль неспецифических хозяев вируса ПГ-3 КРС, являющихся резервуаром и дополнительным источником возбудителя. Кроме того, установлено, что вирус ПГ-3 КРС размножается в альвеолярных макрофагах, не разрушая их, однако при низких температурах происходит высвобождение вируса и реинфицирование животных [20].

**Патологоанатомические изменения** наблюдаются преимущественно в органах дыхания. При вскрытии животных после экспериментального заражения вирусом ПГ-3 КРС обнаружены гиперемия слизистой оболочки верхних дыхательных путей, уплотнение центральных долей легких, увеличение бронхиальных и за-глоточных лимфоузлов.

При электронной микроскопии вирусные частицы находят в местах поражения трахеи и бронхиол, таким образом, вирус, разрушая эпителий дыхательных органов, создает благоприятные условия для размножения патогенной микрофлоры [14].

При гистологическом исследовании видны многочисленные внутриклеточные и цитоплазматические включения, а также клеточная и экссудативная инфильтрация органов и тканей респираторного тракта. Кроме того, могут быть дегенеративные и пролиферативные изменения в эпителии альвеол и бронхиол, инфильтрация мононуклеарными и полиморфоядерными лейкоцитами, образование многоядерных гигантских клеток, а также внутриядерных и цитоплазматических телец-включений.

Вирус ПГ-3 КРС поражает не только эпителиальные клетки респираторного тракта, но и пневмоциты II типа и альвеолярные макрофаги, нарушая тем самым естественный защитный мукоцилиарный барьер и способствуя

размножению бактериальной микрофлоры и развитию бронхопневмонии [9].

**Иммунитет.** У переболевших животных развивается стойкий гуморальный иммунный ответ, характеризующийся образованием вирус-специфических антител к гемагглютинину и нейраминидазе. Вируснейтрализующие антитела преимущественно направлены против гемагглютинин-нейраминидазы (HN) и, в меньшей степени, против белка F. Роль клеточного ответа в протективном иммунитете изучена недостаточно. Стерильный иммунитет является краткосрочным, как к большинству респираторных вирусов, поэтому животные могут быть реинфицированы уже через несколько месяцев [9].

Высокий уровень сывороточных антител после переболевания или вакцинации предупреждает трансплацентарную передачу вируса плоду, предотвращая аборты и инфицирование плода. Интраназальная вакцинация вызывает образование секреторных антител в слизистой оболочке респираторного тракта и при их достаточно высоком уровне может обеспечить защиту от заражения вирусом ПГ-3 [12].

Вакцинация глубокостельных коров и выпаивание молозива их новорожденным телятам ведет к формированию колострального иммунитета, который сохраняется у телят от 10 недель до 8 месяцев. Колостральные антитела не обеспечивают полную защиту от инфицирования, однако часто предотвращают развитие клинического проявления болезни.

**Диагностика.** На основании клинических, патологоанатомических и эпизоотологических данных можно поставить только предварительный диагноз, для подтверждения диагноза на ПГ-3 КРС необходимо проведение лабораторных исследований. Лабораторная диагностика включает в себя

обнаружение антигена вируса ПГ-3 КРС в патологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или в реакции иммунофлюоресценции (РИФ); выделение вируса в культуре клеток с последующей его идентификацией в РИФ, ПЦР или в реакции нейтрализации (РН); обнаружение вирусспецифических антител в сыворотке крови больных и переболевших животных.

Серологическая диагностика основана на обнаружении специфических антител в сыворотке крови больных и переболевших животных в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), реже в РН или иммуноферментным методом (ИФА). Для подтверждения диагноза необходим 4-кратный и более прирост титра антител в парных пробах сыворотки крови больных или переболевших (но не связанных с проведением вакцинации) животных.

Обнаружение возбудителя в тканях, органах и торакальной жидкости или антител к нему в сыворотке крови плода или мертворожденного теленка указывает на пренатальное инфицирование вирусом ПГ-3 КРС [11].

**Специфическая профилактика и меры борьбы.** Для специфической профилактики применяют живые аттенуированные и инактивированные вакцины, часто в комбинации с вирусом инфекционного ринотрахеита/инфекционного пустулезного вульвовагинита, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом диареи, пастереллами и другими патологическими агентами, поражающими респираторные органы.

Повсеместное распространение, отсутствие специфических клинических признаков, разнообразие неспецифических хозяев — резервуаров инфекции затрудняют борьбу с данным заболеванием. Вакцинация остается основным способом борьбы с данным забо-

леванием. Одной из успешных схем вакцинации является интраназальная вакцинация телят в первые дни жизни с последующей бустерной иммунизацией парентеральными вакцинами [7, 8]. Вакцины против ПГ-3 КРС также могут использоваться для иммунизации овец.

В настоящее время в нашей стране основным нормативным документом, регламентирующим проведение мероприятий по борьбе с ПГ-3 крупного рогатого скота, являются «Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов парагриппа-3», утвержденные приказом Минсельхоза России от 17 июня 2019 года. Данный документ устанавливает обязательные требования к организации и проведению мероприятий по ликвидации ПГ-3, предотвращению его возникновения и распространения на территории Российской Федерации, определению границ территории, на которую должен распространяться режим ограничительных мероприятий и (или) карантина, в том числе в части определения очага болезни животных, осуществления эпизоотического зонирования, включая определение видов зон в целях дифференциации ограничений, установленных решением о введении режима ограничительных мероприятий и (или) карантина, ограничений производства, перемещения, хранения и реализации товаров, подлежащих ветеринарному контролю (надзору), и требования к особенностям применения таких ограничений, в том числе проведению мероприятий в отношении производственных объектов, находящихся в карантинной зоне.

## Литература

1. Мищенко В.А., Костыркин Ю.А., Яременко Н.А., Лисицын В.В., Ручнов Ю.Е., Гетманский О.И. Вакцинация новорожденных телят против ИРТ и ПГ-3 КРС. Ветеринария. 2003; 7: 19–22.
2. Пчельников А.В. Этиология, возрастная и сезонная динамика вирусных респираторных болезней телят в племенных хозяйствах. Дис. ... канд. вет. наук. ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. М., 2017.
3. Сергеев В.А. Вирусные вакцины. Киев: Урожай, 1993.
4. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М. ВНИТИБП. 1998.
5. Anderson M.J., Blanchard P.C., Barr B.C., Hoffman R.L. A survey of causes of bovine abortion in the San Joaquin Valley of California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1990; 2: 283–287.
6. Bryson D.G. Parainfluenza-3 virus in cattle. In *Infectious Diseases of Ruminants*, Z. Dinter, B. Morein. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers. 1990; 319–333.
7. Bryson D.G., Adair B.M., McNulty M.S., McAliskey H., Bradford H., Allan G., Evans R.T., Forster F. Studies on the efficacy of intranasal vaccination for the protection of experimentally induced parainfluenza type-3 virus pneumonia in calves. *Vet. Rec.* 1999; 145: 33–39.
8. Ellis J.A. Bovine parainfluenza-3 virus. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 2010; 26(3): 575–593.
9. Fenner's Veterinary Virology by N. James MacLachlan, Edward J. Dubovi. 5th Ed. AcademicPress. 2020; 328–351.
10. Frank G.H. Parainfluenza type-3. In *Veterinary Diagnostic Virology: A Practitioners Guide*, edited by A.E. Castro, W.P. Heuschele. St.Louis: Mosby Yearbook. 1992; 114–116.
11. Kahrs R.F. *Viral diseases of cattle*. 2nd ed. Ames: Iowa State University Press. 2001.
12. Marshall R.G., G.H. Frank. Clinical and immunological response of calves with colostrally acquired maternal antibody against parainfluenza-3 virus to homologous viral infection. *Am. J. Vet. Res.* 1975; 36: 1085–1089.
13. Mehinagic K., Pilo P., Vidondo B., Stokar-Regenscheit N., Mehinagic K. et al. Coinfection of Swiss cattle with bovine parainfluenza virus 3 and *Mycoplasma bovis* at acute and chronic stages of bovine respiratory disease complex. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2019; 31(5): 674–680.
14. Oliveira T.E.S., Pelaquim I.F., Flores E.F., Massi R.P., Valdiviezo M.J.J., Pretto-Giordano L.G., Alfieri A.A., Saut J.P.E., Headley S.A. *Mycoplasma bovis* and viral agents associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019. doi: 10.1111/tbed.13223. Online ahead of print.
15. Reisinger R.C., Heddleston K.I., Manthei C.A. A mixovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1959; 28: 45–49.
16. Stott E.J., L.H. Thomas, A.P. Collins, S. Crouse, J. Jebbett, G.S. Smith, P.D. Luther, R. Caswell. A survey of virus infections in the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J. Hyg. (Camb.)*. 1980; 85: 257–270.
17. Swift B.L. Bovine parainfluenza-3 virus experimental fetal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1973; 163: 861–862.
18. Swift B.L., Trueblood M.S. Failure to induce fetal infection by inoculation of pregnant immune heifers with bovine parainfluenza-3 virus. *J. Infect. Dis.* 1973; 127: 713–717.
19. Swift B.L., Kennedy P.C. Experimentally induced infection of in utero fetuses with bovine parainfluenza-3 virus. *Am. J. Vet. Res.* 1972; 33: 57–63.
20. Tsai K.S. Replication of parainfluenza type-3 virus in alveolar macrophages:

Evidence of *in vivo* infection and of *in vitro* temperature sensitivity in virus maturation.  
*Infect. Immunol.* 1977; 18: 780–791.

21. «Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и

иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов падагриппа-3», утв. приказом Минсельхоза России N 334 от 17 июня 2019 года.

# БЛЮТАНГ

Власова Н.Н.

Определение болезни. Блютанг (Bluetongue, «синий язык», катаральная лихорадка овец (КЛО), *Febris catarrhalis ovinum*, инфекционная катаральная лихорадка, *Febris catarrhalis infectiosa*) — трансмиссивное вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, особенно языка, желудочно-кишечного тракта, эпителия венчика и основы кожи копыт, а также дистрофическими изменениями в скелетных мышцах. У беременных животных могут быть abortы и рождение уродливого потомства [1].

Вирус «синего языка» (ВТ) имеет широкое распространение по всему миру и передается кровососущими членистоногими. Географическое ограничение его ареала частично связано с климатическими и экологическими условиями, необходимыми для обитания переносчиков, которыми, как правило, являются мокрецы рода *Culicoides*. До недавнего времени ареал его распространения располагался от 35° до 45° параллели, но с начала 1990-х годов зона поражения ВТ значительно расширилась, захватывая территории даже за пределами 50-й параллели северной широты.

В естественных условиях к заражению вирусом блютанга восприимчивы овцы, крупный рогатый скот, олени, верблюды, буйволы, козы и некоторые другие виды диких жвачных. Согласно классификации Государственного комитета по эпидемиологическому надзору, он отнесен ко 2-й группе патогенности для человека.

Большинство проявлений блютанга у диких жвачных животных и крупного рогатого скота являются субклиническими. Эта болезнь, как правило, счита-

ется болезнью улучшенных пород овец, особенно тонкорунных, хотя блютанг также был зарегистрирован у крупного рогатого скота и некоторых видов диких жвачных, включая белохвостых оленей (*Odocoileus virginianus*), антилопу пронгхорн (*Antilocapra americana*) и снежного барана (*Ovis canadensis*) в Северной Америке, а также европейского бизона (*Bison bonasus*) и яка (*Bos grunniens*) в Европе [1–3].

**Краткая историческая справка.** Блютанг как болезнь овец и крупного рогатого скота была открыта в конце XVIII века французским биологом Francois de Vaillant во время его путешествия на мыс Доброй Надежды в 1781 г. и 1784 г. [4]. 40 годами позже начальник ветеринарной службы колонии Мыса Duncan Hutton описал основные клинические признаки этой болезни в ежегодном рапорте за 1880 г., а в 1902-м она была названа «малярийной катаральной лихорадкой овец» в сообщении в *Veterinary Record*, где было отмечено, что агент, вызывающий болезнь, разносится насекомыми [5].

В 1902 г. Spreull впервые доложил результаты своих экспериментов по изучению малярийной катаральной лихорадки на овцах (Spreull, 1902). Затем в 1905 г. он описал типичные случаи болезни, проявляющейся в лихорадочном состоянии с развитием через 7–10 дней характерных признаков поражения ротовой полости и посинения языка. Вследствие наличия такого уникального признака он предложил изменить название с малярийной катаральной лихорадки на блютанг (ВТ — bluetongue) [6].

Robertson и Theiler впервые показали, что вызывающий блютанг агент является

фильтрующимся. Далее Spreull самостоятельно доказал, что он может быть передан и крупному рогатому скоту, и козам, но инфекция у этих жвачных протекает бессимптомно [6].

Изначально блютанг был зарегистрирован в Южной Африке, и в начале XX в. эту проблему считали актуальной только для стран африканского континента. Впоследствии в середине XX в. эпизоотии блютанга были зарегистрированы в США, странах Средиземноморского бассейна, Ближнем Востоке, Азии, а также данная вирусная инфекция была выявлена в Австралии в 70-х годах прошлого столетия [7, 8, 9]. В настоящее время болезнь зарегистрирована на всех континентах, за исключением Антарктиды [10].

За пределами Африканского континента болезнь с диагнозом «стоматит» впервые была зарегистрирована на острове Кипр в 1924 г. [10]. Почти через 20 лет она возникла на восточном побе-

режье Средиземного моря и Ближнем Востоке: в 1943 г. зарегистрирована в Пакистане, Палестине и Сирии, в 1944 г. — в Турции, в 1947 г. — в Израиле [11, 12].

Продолжающаяся экспансия этого возбудителя привела к массовому поражению овец блютангом на западном побережье Средиземного моря: в 1957 г. — в Португалии, в 1958 г. — в Испании, в 1963 г. блютанг выявили на юго-востоке Азии — в Индии, в 1979 г. — в Закавказье в Ильичевском районе Нахичеванской АССР, куда вирус, вероятно, был занесен из сопредельной Турции [13, 14].

Далее блютанг распространился в страны Западного полушария — в 1948 г. в США. Заболеваемость овец доходила до 50%. А в 1962—1964 гг. блютанг был зарегистрирован в странах Южной Америки [15, 16].

В Европе повторно болезнь появилась в Испании и Португалии в 1956 г., а в 1972 г. — в Египте [17].



В последние годы 20 столетия наблюдалось ухудшение эпизоотической ситуации по блютанту в странах Южной и Центральной Европы [18,19], а начало XXI века ознаменовалось эпизоотиями, вызванными вирусом ВТ не только среди овец, но и у КРС [20].

Современная экспансия блютанга, начавшаяся в 1998 г. в Европе, переросла в эпизоотию. Повторно пораженными блютангом оказались Турция и Болгария. К 2005 г. болезнь начали регистрировать в странах Северной Африки (Тунис, Алжир, Марокко, Мавритания), Ближнего Востока (Турция, Израиль), Южной Европы (Сербия, Хорватия, Греция, Косово, Италия, Испания, Португалия) [21–28], откуда блютанг был занесен во Францию. Обострение ситуации произошло также в Юго-Восточной Азии (Китай, Япония) [29] и Южной Америке (Бразилия).

Средний индекс заболеваемости был сравнительно низким — в пределах от 0,3 до 22,7%, а индекс летальности — от 0 до 46,9%. Из мер борьбы с блютангом, по данным МЭБ, применяли карантинирование, контроль за переносчиками, скрининг, зонирование, санитарный убой; в одних странах проводили вакцинацию, а в других установили запрет на вакцинацию [30].

Таблица 1. Эпизоотологическая характеристика вспышек блютанга, возникших в 2006 г. в Европе (Стрижаков А.А., 2007 г.)

Страна	Число очагов	Количество животных в очаге	Заболело	Пало	Индекс заболеваемости, в %	Индекс летальности, в %
Алжир	34	6592	317	53	4,8	16,7
Марокко	246	56081	971	147	1,7	15,14
Польша	1	255	3	0	1,2	0
Бельгия	393	18 836	369	173	2,19	46,9
Германия	39	3434	779	...	22,7	...
Нидерланды	29	3751	142	0	3,8	0
Франция	5	1086	3	1	0,3	33,7
Испания	119	36 782	1477	139	4%	9,4
Португалия	2	480	79	32	16,5	40,5
Италия	35	4602	267	41	5,8	15,4
Болгария	13	850	86	0	10,12	0

Сводные данные по основным показателям эпизоотического процесса блютанга за 2005–2006 гг. представлены в табл. 1.

В 2006–2008 гг. ВТ-8 широко распространился в европейских странах, включая Нидерланды, Бельгию, Италию, Германию, Северную Францию, Люксембург, Великобританию, Данию и Швейцарию. Вариант 8 серотипа ВТ, который первоначально распространился по всей Европе, являлся высоко вирулентным для многих видов животных, что вызвало самую экономически разрушительную вспышку блютанга в современной истории [31].

Этот вирус быстро распространился и охватил многие страны Европы, в том числе и скандинавские страны, которые расположены значительно севернее, чем регионы, где когда-либо вирус блютанга регистрировался ранее.

## Блютанг в России

На территории бывшего СССР в 1987–1989 гг. у животных выявляли антитела к вирусу блютанга при обследовании в Украине, Молдавии, Средней Азии, где очевидно болезнь протекала без клинического проявления. В

рамках современной России до конца XX века болезнь считалась экзотической, поскольку всего две вспышки блютанга были зарегистрированы и успешно ликвидированы в 1994 году. Однако ранее, в 1988 г., было обнаружено наличие специфических антител к вирусу блютанга у овец на территории Забайкальского округа. Антилаквирусублютангвыявили в трех из 13 обследованных районов Бурятии и Читинской обл.: у 16–65% обследованных овец в титрах 1:25 и выше, хотя 8 лет назад антитела у животных в этих областях отсутствовали. Ретроспективный анализ показал, что гибель овец не превышала 20%. Такая «скрытая» форма циркуляции вируса блютанга подтвердилась лишь при последующем обнаружении животных с клинической формой проявления болезни в одном из районов Бурятии [32].

На современном этапе наибольший риск возникновения блютанга в РФ был сопряжен с импортируемым крупным рогатым скотом из стран Европейского союза. Схемы лабораторного контроля КРС и МРС для продажи в РФ до 2006 г. были согласованы сторонами между страной-экспортером и РФ на основании рекомендаций Санитарного кодекса МЭБ [33]. После подтверждения блютанга в Германии, Нидерландах, Бельгии [34, 35] и последующего развития эпизоотии тестирование ввезенных, находящихся в карантине животных на территории РФ было максимально полным, со 100% выборкой и одновременным тестированием двумя реакциями — ОТ-ПЦР и с-ИФА [36].

Несмотря на отбор животных из свободных от блютанга зон Германии и Нидерландов, а также отрицательных результатов лабораторной проверки животных в карантинных станциях при формальном соблюдении санитарных правил транспортировки в стране-экс-

портере, с сентября 2007 г. после ввоза на территорию РФ на карантине стали регулярно обнаруживать небольшую часть ПЦР- и/или сероположительных животных.

Привнесенный в Россию с импортным скотом вирус блютанга принадлежал к двум серотипам:

- в Смоленской и Калужской областях был выделен вирус блютанга 14 серотипа от импортного крупного рогатого скота, ввезенного из Германии в 2011 г., и местного мелкого рогатого скота, содержащегося на территории Смоленской области [37];

- в Нижегородской области выделили вирус блютанга 8 серотипа от крупного рогатого скота, ввезенного в 2007 г. из Германии и Голландии [38].

Россия официально сообщила в МЭБ в декабре 2011 г. о случаях выявления субклинической формы блютанга в д. Коршуны Угранского р-на Смоленской обл. среди импортных животных.

Начиная с 2006 г. на территории Российской Федерации ежегодно выявлялись положительно реагирующие/больные животные с блютангом (Северо-Кавказский, Центральный, Приволжский, Уральский ФО). Всего за период с 2006 по 2011 гг. было ввезено примерно 172 000 гол. животных в фермы, расположенные на всей территории европейской части РФ, Урале и незначительное количество — в Алтайском крае. Несмотря на то, что по требованию Россельхознадзора в странах-экспортерах были модифицированы схемы контроля блютанга, среди ввезенных животных по-прежнему обнаруживали единичных сероположительных и ПЦР-положительных особей КРС по 2011 г. включительно [38].

При проведении мониторинговых исследований импортного и отечественного крупного рогатого скота на блютанг в 2012 г. выявлены серопози-

тивные животные в Смоленской области, Калужской области, Воронежской области, Нижегородской области, Тюменской области, Тверской области, Республике Татарстан, Республике Тыва. В июле 2012 г. патматериал был направлен в референтную лабораторию ЕС по блютангу, где также была подтверждена принадлежность вируса к 14-му серотипу. Штамм оказался на 99,9% идентичным вакцинному штамму BTV-14RSArrgg/14, входящему в состав коммерческой поливалентной аттенуированной вакцины ЮАР, содержащей вирусы блютанга 1, 4, 6, 12 и 14 серотипов [39, 40].

Во втором полугодии 2014 г. выявились серопозитивные животные среди импортного скота в Краснодарском крае и в Калининградской области. За три квартала 2015 г. регистрировались случаи положительной диагностики среди импортного скота в Смоленской и Псковской областях. По данным Центра ветеринарии, на блютанг в РФ было исследовано в 2013 году 31 507 голов КРС, в 2014 году — 64 596 голов КРС, за 3 квартала 2015 года — 35 319 голов КРС.

ВТ — это заболевание, подлежащее обязательной нотификации в соответствии с Кодексом здоровья наземных животных МЭБ. В современных условиях широкая экологическая ниша и потенциальное географическое распространение вируса ВТ отражают опасность дальнейшего продвижения заболевания по всему миру в тропических, субтропических и умеренных регионах. При существующих погодных аномалиях и измененных климатических условиях прогнозируется дальнейшее расширение ареала распространения блютанга, наиболее вероятно в Центральной Африке, США и западной части России [41, 40]. Поскольку субклиническое проявление

инфекции характерно для блютанга во многих регионах мира, в том числе на большей части Северной и Южной Америки, основные ограничительные мероприятия осуществляются путем введения торговых барьеров, которые ограничивают движение живых жвачных животных и спермы между безвирусными и энзоотическими регионами [42, 43].

Распространение ВТ в мире имеет наибольшее экономическое значение для производства овец и КРС, хотя тяжесть заболевания значительно варьирует в зависимости от штамма вируса, породы животного и экологических стрессов.

## Структура вируса блютанга

**Строение вириона.** Возбудитель блютанга — это РНК-содержащий вирус, который относится к семейству *Reoviridae*, роду *Orbivirus* [44]. Вирусные частицы содержат 80% белка и 20% нуклеиновой кислоты. Вирионы семейства имеют двадцатигранный бислойный капсид, состоящий из 32 капсомеров и сегментированный двунитчатый РНК-геном. Члены рода *Orbivirus* отличаются от вирусов других родов, кроме *Coltiviruses*, основанием структуры внешнего слоя капсида вируса и числом двунитчатых сегментов РНК-генома [45].

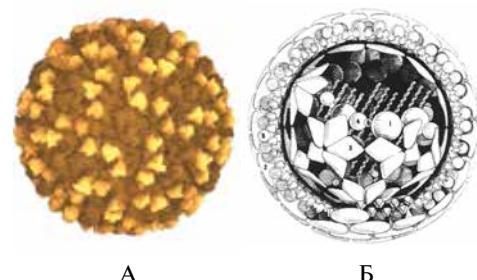


Рис. 1. Вирион вируса блютанга [46]

Внешний капсид состоит из двух мажорных белков VP2 и VP5 [47]. На рис. 1б показаны белки внешней оболочки (наружного капсида) VP2(2) и VP5(5), окружающие тримеры VP7(7) кора. Пентамеры белка VP3(3) создают платформу для тримеров белка VP7 и окружают глубокие слои кора, состоящие из минорных белков VP1(1), VP4(4) и VP6(6), а также 10 (8) сегментов двухцепочечной РНК.

Таким образом, вирион имеет сложно структурированный капсид (рис. 1), его самая внутренняя структура — субкор имеет икосаэдрический тип симметрии, но, как правило, он выглядит сферическим [48]. Максимальный диаметр наружного субкора — 59 нм, внутреннего — 46 нм, он построен из мажорного белка VP3 [49]. VP3 покрывает поверхность кора, образованную 3 минорными белками (VP1, VP4 и VP6), расположенным над 10 сегментами двусpirальной геномной РНК вируса. На субкоре располагается второй мажорный белок VP7(T=13) [50]. Минорные коровые белки (транскриптазный комплекс) прикреплены к внутренней поверхности субкора по линиям пятиосной симметрии. Сборка субкорового слоя определяет конечный размер и сим-

метрию вирусной частицы (диаметр до 80 нм). Коровые частицы имеют характерные кольцевидные капсомеры. Репликация сопровождается продукцией вирусных «трубочек» (*tubules*) и вирусных телец-включений [51, 52]. Коровый мажорный протеин (VP7) может формировать в цитоплазме клеток гексагональные кристаллы [53].

При обычной электронной микроскопии поверхность вириона неструктурирована, однако внешний капсид имеет икосаэдрический тип симметрии и парусообразные поверхностные выступы (шипы), которые могут быть обнаружены на вирионе при использовании криоэлектронной микроскопии [54].

После удаления внешнего капсидного слоя можно различить поверхностный слой коровой частицы, который полностью состоит из капсомеров белка VP7, представленных в виде гексамерных колец по пятиграммным вершинам. Эти кольца, также легко различимые при использовании обычной электронной микроскопии, и послужили основой для названия рода.

Аналогично другим реовирусам и ротавирусам, зрелый вирион вируса блютанга не имеет липидной оболочки [55]. Хотя выход из клетки осуществляется почкованием через плазматическую мембранны, сформировавшаяся при почковании липидная оболочка вскоре теряется.

**Геном вируса блютанга** представлен десятью отдельными сегментами двусpirальной РНК, которые принято обозначать L1, L2, L3, M4, M5, M6, S7, S8, S9, S10 в соответствии с различием электрофоретической подвижности в 1% агарозном геле [56, 57]. Размер сегментов генома вируса блютанга варьирует от 822 до 3954 bp, сум-

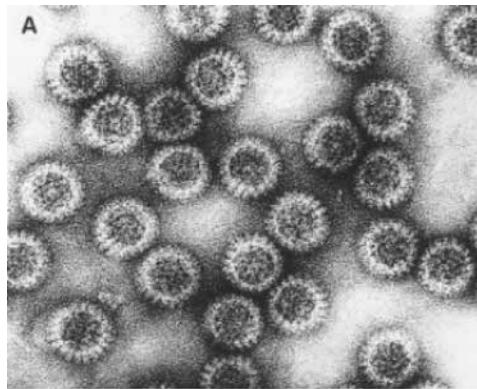


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение вирионов вируса блютанга [46]

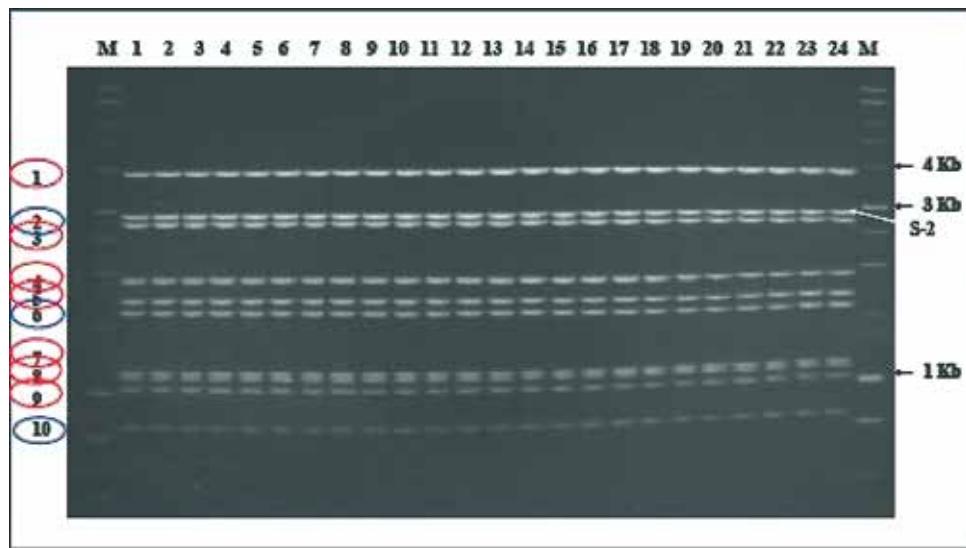


Рис. 3. Подвижность сегментов геномной РНК в агарозном геле (синим отмечены вариабельные сегменты, красным — консервативные) [60]

марный размер достигает 21,1 т.п.о. Сегменты геномной РНК вируса блютанга подразделены по подвижности на 3 класса: 3 крупных L (1–3; 3,9–2,8 т.п.о.), 3 средних M (4–6; 2,0–1,6 т.п.о.) и 4 малых сегмента S (6–10; 1,2–0,8 т.п.о.) [56]. Каждый сегмент двусpirальной РНК кодирует по одному белку, за исключением самого маленького сегмента S10, который кодирует два вирусспецифических белка [58]. Последовательность 10-го сегмента имеет два консервативных метиониновых кодона, следовательно, белки транслируются с альтернативных сайтов инициации. Делекция первого AUG триплета нарушает синтез первого белка, но не затрагивает синтез второго [59].

Таким образом, геном вируса блютанга кодирует 11 белков.

**Белки вируса блютанга.** Кроме 7 структурных белков, в инфицированных клетках обнаруживают 4 неструктурных белка NS1, NS2, NS3 и NS3A, 2 последних из них кодируются сегментом S10 [61].

В инфицированной клетке проинфицированные вирионы диссоциируют на частицы кора (420S), состоящие из белков VP1, VP3, VP4, VP6, VP7 и вирусной РНК-зависимой-РНК-полимеразы, с помощью которой на геномной матрице синтезирует мРНК [62, 63].

Самый крупный вирусный белок блютанга VP1 имеет массу 150кДа и кодируется самым большим сегментом двусpirальной РНК — L1 [64]. Белок VP1 присутствует в вирионе в небольшом количестве. Основываясь на его размере, локализации, количественном содержании в коре и предполагаемой аминокислотной последовательности, очевидно, что этот белок является вирусной РНК-полимеразой. Рассчитанная аминокислотная последовательность этого белка имеет высокий уровень гомологии не только с полимеразами различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, но и с субъединицами полимераз прокариот и эукариот [65].

Таблица 2. Белки вируса блотанга

Сегмент генома	Размер сегмента, п.о.	ORF, п.о.	Кодируемый белок	Размер белка, аминокислот	Предполагаемая масса, кДа	Кол-во молекул белка на вирион	Локализация белка в вирионе	Функция белка
L1	3954	12–1917	VP1 (Pol)	1302	149,588	$\approx 6*10$	Внутренний кор	РНК-зависимая РНК-полимераза
L2	2926	20–2887	VP2	956	111,112	180†	Верхний слой внешнего капсида	Структурный белок, определяет серотип вируса (типоспецифический) и его вирулентность, участвует в прикреплении к клетке, легко разрезается протеазами. Наиболее вареабельный белок. Реагирует с нейтрализующими антителами. Тример
L3	2772	18–2720	VP3 (T2)	901	103,344	60†120	Кор	Структурный белок, формирует платформу для тримеров белка VP7. Формирует внутреннюю основу протинового капсидного чехла, симметрия T=2, определяет конечный размер и структуру капсида, связывает РНК, взаимодействует с минорными внутренними белками
M4	2011	9–1970	VP4 (Cap)	654	76,433	$\approx 5*20$	Внутренний кор	Димер. Трансметилаза 1 и 2, кэпприрующий энзим — гуанилтрансфераза
M5	1639	35–1690	VP5	526	59,163	120–360	Наружная оболочка	Структурный белок. Образует внутренний слой внешнего капсида, гликозилирован, частично определяет серотип вируса, вариабельный. Тример
M6	1770	30–1607	NS1 (TuP)	552	64,445	но‡	Не структурный	В цитоплазме образует трубочки, функция которых не ясна. Характерно для репликации орбивирусов
S7	1156	18–1064	VP7 (T13)	349	38,548	780†	Поверхность коры	Группоспецифический структурный белок. Тример. Образует внешнюю поверхность коры, симметрия T=13. У некоторых видов (AHSV) образует гексагональные кристаллы, участвующие в проникновении в клетку и поддержании инфекционности коровой частицы в клетках насекомых-переносчиков. Взаимодействует с антителами, нейтрализующими кор. Иммунодоминантный видоспецифический антиген
S8	1123	20–1019	NS2 (ViP)	357	40,999	60	Не структурный	Белок, связывающий мРНК. Участвует в образовании матрикса телец-включенияй, фосфорилирован. Может быть ассоциирован с внешним капсидом
S9	1046	16–999	VP6 (Hel)	328	35,750	$\approx 37^*$	Внутренний кор	Белок, связывающий одно- и двухцепочечную РНК. Обладает хеликазной и NTPазной активностью
S10	822	20–706	NS3 NS3A	229 216	25,572 24,020	но но	Не структурный	Гликопротеины, мембранные белки, участвуют в выходе вириона из клетки. У некоторых видов (AHSV) являются вареабельными протеинами и определяют вирулентность

*Примечание:*

\* значения определены Huismans &amp; van Dijk [66];

† значения определены методом криоэлектронной микроскопии [67];

‡ но — не определено.

Во время транскрипции мРНК вируса блютанга на 5'-конце кэпируется и метилируется, как и у других рео-и ротавирусов. Фермент, отвечающий за кэпирование, — РНК-гуанилтрансфераза является вирусспецифическим белком [68, 69]. Данные, полученные Mertens и Burroughs (1990), показывают, что GTP-комплекс кора катализирует кэпирование мРНК вируса блютанга, а гуанилтрансферазная активность связана с минорным белком кора — VP4.

Третий минорный белок — VP6 кодируется небольшим 9-м фрагментом (S9) РНК вируса блютанга. Белок VP6 имеет молекулярную массу 36 кДа [71] и содержит значительное количество аргинина, лизина и гистидина [72], обеспечивая тем самым высокое сродство к нуклеиновым кислотам — имеет высокий аффинитет к одно- и двусpirальным РНК даже в присутствии SDS [71]. Кроме того, анализ аминокислотной последовательности белка VP6 показал наличие участков, гомологичных хеликазам, которые способствуют раскручиванию двусpirальной РНК, что предшествует синтезу мРНК. Таким образом, минорные компоненты вириона VP6, VP1 и VP4 являются составными компонентами РНК-полимеразного комплекса.

Белки VP3 и VP7 являются мажорными белками кора, причем VP7 присутствует в коре в большем количестве. Так, по данным Verwoerd, содержание в вирионе белка VP3 составляет 16,2%, а белка VP7 — 34,9%. Белок VP7 располагается на поверхности коровых частиц, образованных белком VP3 и составляющих внутреннюю оболочку (главная структура субкора). Белок VP7 кодируется небольшим сегментом РНК — S7 и имеет массу 38 кДа [73]. VP7 — чрезвычайно гидрофобный белок, но его отличительной чертой является то, что он содержит лишь один-единственный лизиновый аминокислотный остаток [75]. Наличие лизина

в положении 255 является неизменным для всех серотипов вируса блютанга [75, 76], в то время как у вируса африканской чумы лошадей (AHSV-4) вместо этого лизина присутствует аргинин.

Методом рентгеноструктурного анализа обнаружено, что очищенный белок VP7 самоаггрегируется и образует тримеры.

Третий по величине сегмент РНК (L3) кодирует белок VP3 с массой около 100 кДа (*табл. 2*); так же как и VP7, VP3 гидрофобен. Этот белок играет важную роль в структурной интеграции вирусного кора. Последовательности, кодирующие VP7 и VP3, весьма консервативны не только среди различных проанализированных серотипов вируса блютанга, но и у вирусов африканской чумы лошадей (AHSV) и эпизоотической геморрагической болезни оленей (EHDV). Анализ белков VP3 и VP7, экспрессированных рекомбинантными бакуловирусами, показал наличие группоспецифических антигенных детерминант [77, 78]. Оба белка обнаруживаются всеми антисыворотками против вируса блютанга, но слабо реагируют с антителами сывороток против AHSV и EHDV [78, 79].

Икосаэдрический кор вируса блютанга заключен в наружный слой капсида, состоящий из белков VP2 и VP5, которые не образуют четких структур в негативно окрашенных препаратах, в отличие от некоторых других реовирусов. Белки VP2 и VP5 кодируются L2 и M5 сегментами РНК соответственно (Verwoerd et al., 1972; Mertens et al., 1984) и являются наименее консервативными у разных серотипов вируса блютанга (Roy et al., 1990).

Белок VP2 наиболее вариабелен, он серотипоспецичен и является вирусным гемагглютинином [80–82]. Идентичность между геномами вирусов 1-, 2-, 10-, 11- и 13-го серотипов составляет 39–73% [83].

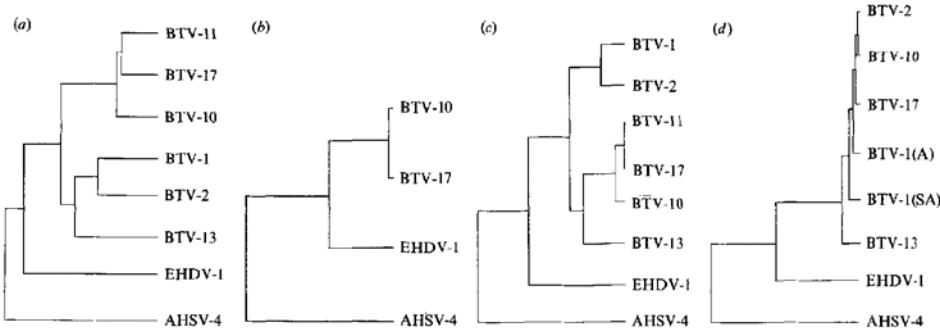


Рис. 4. Дендрограмма, показывающая связь между белками VP2 (а), VP3 (б), VP5 (в) и VP7(д) различных серотипов вируса блютанга, EHDV-1 и AHSV-4, и построенная при помощи программы CLUSTAL V [84] с параметрами по умолчанию

В противоположность белку VP2, о функциях белка VP5 известно очень мало. Он более вариабелен по сравнению с другими белками кора, но менее вариабелен по сравнению с белком VP2. Первичная структура белка VP5 большинства серотипов весьма схожа (рис. 4с) и на 94% состоит из одних и тех же аминокислот [85]. Хотя белок локализован в наружном капside, его взаимодействие с антителами не приводит к явной нейтрализации вирусной активности. По данным Marshall и Roy (1990), анти-sыворотка, полученная к белку VP5, не проявляет вируснейтрализующей активности *in vitro*. В противовес этим результатам исследования по вакцинации овец белком VP2 и сочетанием белков VP2 и VP5 показали [87], что не все овцы, вакцинированные лишь одним белком VP2 в дозе >50 мкг/голову, имели защиту от экспериментального заражения вирулентным вирусом. В то же время вакцинация 20 мкг белка VP5 совместно с 50 мкг белка VP2 защищала всех вакцинированных овец и приводила к высокому уровню накопления вируснейтрализующих антител в крови иммунизированных животных. Следовательно, VP5 усиливает иммунный ответ, взаимодействуя с белком VP2, и обуславливает его конформационные свойства.

В клетках, инфицированных вирусом блютанга, обнаружено 4 неструктурных белка. Два мажорных неструктурных белка — NS1 и NS2 синтезируются в большом количестве, тогда как два миорных, тесно связанных между собой белка NS3 и NS3A выявляются очень слабо. Последовательности всех четырёх неструктурных белков высоко-консервативны (96%) среди штаммов различных серотипов вируса блютанга [88]. Синтез белков NS1 и NS2 в клетках, зараженных вирусом блютанга, совпадает с формированием вирусспецифических структур — трубочки и гранул (вирусные тельца-включения (VIBs) viral inclusion bodies), характеризующих цитоплазму клеток, пораженных орбивирусом [89]. Вирусные тельца-включения имеют гранулярную и фибриллярную структуру и обнаруживаются вблизи ядра или рассредоточены по всей клетке [90]. Предполагается, что эти морфологические структуры служат для прикрепления вируса к филаментозным компонентам цитоскелета клетки [91] и вовлечены в процессы его репликации и транспортировки.

Трубочки полностью состоят из одного типа белка NS1 весом 64 кД, являющегося продуктом экспрессии гена 6-го сегмента (S6) РНК (табл. 1) [92].

Этот белок является наиболее синтезируемым, в отличие от всех остальных белков вируса блутанга [93]. NS1 богат цитозином, он имеет строго упорядоченную структуру, стабилизированную дисульфидными связями [88], и несколько высоко гидрофобных областей, которые принимают участие в формировании трубчатых структур. Трубочки являются мультимерной формой только одного белка — NS1 [93].

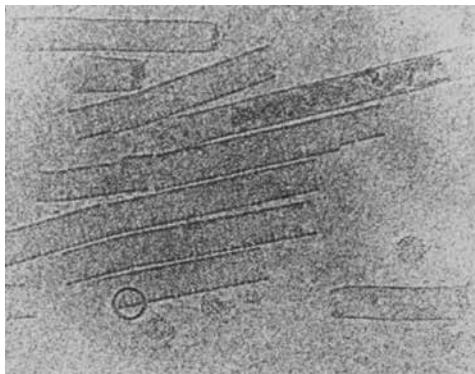


Рис. 5. Криоэлектронная микрофотография трубочек белка NS1 вируса блутанга [94]

Структурные белки вируса блутанга неfosфорилированы. Единственный фосфопротеин, обнаруживаемый в клетках, зараженных вирусом блутанга, — белок NS2 [95]. Этот белок, кодируемый 8-м сегментом (S8) геномной РНК вируса, синтезируется в большом количестве, что говорит о важной роли в процессе репродукции вируса.

Белок NS2 в наибольшем количестве локализуется в вирусных тельцах-включениях и не связан с вирионами [96]; данный белок представлен мультимерной формой [97].

В отличие от белков NS1 и NS2, два самых маленьких неструктурных белка NS3 и NS3A синтезируются в клетках, инфицированных вирусом блутанга, в небольшом количестве. Как установлено при изучении *in vitro*, NS3 и NS3A

кодируются 10-м сегментом двухцепочечной геномной РНК [98]. Пептидные карты и иммунологические исследования показали, что белки NS3 и NS3A взаимосвязаны [99].

В иммуно-электронно-микроскопическом исследовании рекомбинантного вакцинного вируса, экспрессирующего белок NS3 [100], показали, что белки NS3 и NS3A связываются с гладким эндоплазматическим ретикулумом и плазматической мембраной. Эти белки участвуют в финальной стадии морфогенеза вируса блутанга, т.е. выходе вируса из инфицированных клеток. Белок NS3 имеет некоторое сходство с гликопротеином ротавируса NS28, который способствует связыванию ротавирусных частиц с эндоплазматическим ретикулумом и приобретению оболочки [101], что говорит о возможной роли белка NS3 в выходе вирусных частиц вируса блутанга из инфицированной клетки.

Устойчивость вируса блутанга. Благодаря компактной структуре вириона и особенностям аминокислотного состава белков обработка 3% формалином инактивирует вирус только за 48–72 часа, а 3% раствором едкого натра, 0,2% раствором Вироцида и 70% спиртом — за 5 минут, также нагреванием вируссодержащей суспензии до 60°C — за 5 минут.

В говядине и баранине при pH 5,6–6,3 вирус быстро инактивируется, а при pH выше 6,3 он может сохранять свою инфекционную активность до 30 суток.

В крови, в водном 1% растворе фенола с добавлением щавелевокислого калия вирус может сохраняться при комнатной температуре в течение нескольких лет. Он хорошо сохраняется в высушенном виде или при температуре ниже минус 20°C. В то же время медленное замораживание до минус 10–20°C быстро разрушает вирус [1].

**Клинические признаки и характер течения блотанга у разных видов жвачных животных.** Тяжесть заболевания варьирует у разных возрастов и видов животных, при этом симптомы наиболее выражены у овец, что приводит к гибели, потере веса и нарушению роста шерсти. У высокопородных овец заболеваемость может достигать 100%. Молодые животные более восприимчивы к болезни [3].

Крупный рогатый скот часто имеет более низкий уровень заболеваемости, чем овцы, проявление и тяжесть клинических признаков варьируют в зависимости от характеристики возбудителя. Например, циркулировавший в Северной Европе в начале века вирус ВТ являлся эпидемиологически значимым из-за проявления клинических признаков у крупного рогатого скота. Смертность в среднем составляла 2–30%, но иногда достигала и 70% [42, 102].

Форма течения болезни варьирует от острой до хронической и даже abortивной. При остром течении основным симптомом является внезапное повышение температуры до 41–42,0°C, сопровождающееся угнетением; продолжительность такой температурной реакции от 2–3 до 7 суток. Гибель животного регистрируют уже через 72–96 часов после заражения. Она может наступать как при высокой, так и при слегка повышенной температуре тела, а при 42°C иногда наблюдается быстрое выздоровление животного.

При подостром течении повышение температуры до 40,5–42,0°C наблюдается через 6–9 суток после заражения [103]. Через 1–2 суток появляются конъюнктивит (*рис. 6а*), гиперемия и отек слизистых оболочек ротовой и носовой полости с появлением точечных кровоизлияний (*рис. 6б*), язык грязно-синего цвета свисает из ротовой полости (*рис. 6в*), развиваются отеки в области головы, межчелюстного пространства, распространяющиеся на шею и грудь (*рис. 6г*).



А



Б



В



Г

Рис. 6. Клинические проявления блотанга у КРС [104]

При подостром и хроническом течении все симптомы развиваются медленнее и выражены слабее. Иногда отмечают бронхопневмонию, вызванную вторичной инфекцией, abortionы у суягных овцематок и стельных коров. Обширные эрозии могут развиваться на щеках и на противоположной коренным зубам стороне языка. Язык может иметь интенсивную гиперемию и стать раздутым и отечным, высываясь изо рта и в тяжелых случаях приобретать синюю окраску. Гиперемия может простираться на другие части тела, особенно паюшую, подмышечную впадину и промежность.



А



Б



В

Рис. 7. Клинические проявления блутанга у овец [105]

Часто наблюдают дегенерацию мускулатуры, дерматит может вызывать выпадение шерсти (*рис. 7а*), а также появляются серозные и гнойные истечения из носа (*рис. 7б*).

Типичен отек с геморрагиями венчика копыт, что часто вызывает хромоту животного и спадание рогового башмака (*рис. 7в*). Нарушение питания кожи приводит к сухости шерсти, которая становится ломкой и выпадает клочьями. Дегенеративно-некротические поражения мышечных волокон и слизистой оболочки пищеварительного тракта ведут к резкому истощению и слабости животных, что обуславливает их медленное выздоровление.

Для КРС характерно появление истечений из носовой полости (*рис. 8а*), а также кровоточащие эрозии и язвы на коже вымени (*рис. 8б*).



А



Б

Рис. 8. Клинические проявления блутанга у КРС

Абортивное течение блютанга характеризуется незначительным повышением температуры, быстро проходящей гиперемией слизистых оболочек ротовой полости, незначительным угнетением: такое течение болезни наиболее часто встречается у овец устойчивых к болезни пород.

Патологоанатомические изменения при блютанге. Вирус блютанга вызывает значительную деструкцию эндотелия сосудов, что сопровождается нарушениями кровообращения в эпителиальной и мышечной ткани, которые приводят к развитию обширных отеков подкожной и межмышечной соединительной ткани и появлению многочисленных кровоизлияний во внутренних органах, а также к дегенеративным изменениям скелетной мускулатуры. Когда овцы погибают в результате острой формы течения блютанга, в легких наблюдают межальвеолярную гиперемию, отеки и бронхиальное дерево заполнено пеной. Грудная впадина может содержать несколько литров серозной жидкости, и на перикардиальном мешке наблюдают много петехиальных геморрагий. В большинстве случаев наблюдают отчетливые геморрагии в основании легочной артерии (*рис. 9а*).

При осмотре павших от блютанга животных обнаруживают истощение трупа, обширные студневидные отеки подкожной клетчатки в области головы, шеи (*рис. 9б*), подгрудка, конечностей, а также многочисленные кровоизлияния в эпикарде, эндокарде, миокарде (*рис. 9в*), реже в трахее, плевре и мочевом пузыре. Слизистые оболочки желудка, преджелудков, тонкого отдела кишечника гиперемированы, также имеются точечные кровоизлияния. Селезенка, как правило, увеличена в размерах, кровенаполнена [106].

В скелетной мускулатуре наблюдаются дистрофические изменения и очаговые некрозы отдельных групп мышц

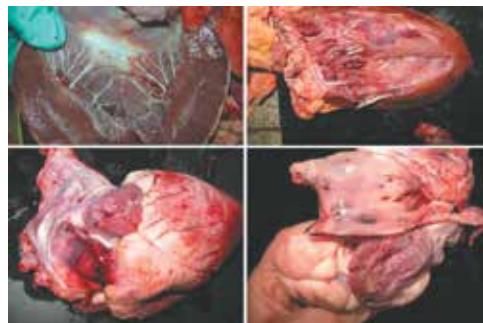
с инфильтрацией межмышечной соединительной ткани, придающей железобелый вид. Нередко пораженные мышцы приобретают серый цвет или имеют некротические очаги, что чаще



А



Б



В

Рис. 9. Патологоанатомическая картина блютанга [106]



А



Б



В

Рис. 10. Патологоанатомическая картина блютнга [107]

всего наблюдается в сосочковых мышцах миокарда.

Слизистая оболочка ротовой полости имеет мелкоточечные кровоизлияния, отечна и гиперемирована, а на языке наблюдаются изъязвления и некрозы (рис. 10а).

В связи с тем, что вирус блютнга проникает через плаценту, у больных суягных и стельных животных отмечают мумификацию (б) или нарушение развития плода [107].

**Диагностика блютнга.** Диагноз устанавливают на основании эпизоотологических данных (сезонность, связь с насекомыми-переносчиками, преобладающее поражение овец), клинических признаков (лихорадка, поражение слизистой оболочки ротовой и носовой полостей, опухание головы, хромота, выпадение шерсти), патологоанатомических изменений (некрозы слизистых оболочек, эрозии и язвы в ротовой полости и на языке, кровоизлияние в мышечной ткани, кишечнике), а также по результатам лабораторного исследования — выявление вируса и обнаружение у переболевших животных антител [108]. Точность постановки диагноза на блютнг, как правило, у домашних и диких жвачных животных с субклинической формой течения болезни в значительной степени зависит от лабораторных методов выделения вируса, выявления вирусспецифических антигенов, вирусных нуклеиновых кислот и антител к нему. Окончательный диагноз на блютнг при первичном заносе ставится после проведения вирусопыделения, идентификации возбудителя и постановки биопробы [109].

В настоящее время, согласно стандартам МЭБ [110], основными методами диагностики блютнга являются выделение и идентификация вируса, обнаружение РНК ВТ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР),

выявление вирусоспецифических антител в сыворотке крови методом иммунодиффузии в геле агара (РИД) и иммуноферментным методом (ИФА).

Хотя РИД проста и быстра в постановке, она не является высокочувствительным или количественным методом анализа и имеет ограничения в своей специфике. Сыворотка, содержащая антитела к другой группе орбивирусов, например эпизоотической геморрагической болезни оленей (ЭГБО), может привести к неспецифической реакции в РИД. Среди нескольких разработанных тест-систем конкурентный метод ELISA, в котором используется групповые специфические моноклональные антитела (МАт) к вирусу ВТ, оказался наиболее чувствительным и специфичным анализом для выявления антител к нему [111]. После всеобъемлющей проверки с-ELISA постепенно заменяет РИД в качестве универсального теста для сертификации жвачных животных в торговых целях и диагностики инфекции ВТ у домашних и диких животных.

Как один из диагностических методов, ранее использовали РСК, но из-за ее ограничений (наличие антикомплémentарной сыворотки и сложность процедуры постановки реакции) тест на связывание комплемента (РСК) практически отменен и используется лишь в нескольких лабораториях.

В настоящий момент ИФА и ПЦР рекомендованы для использования в референтных лабораториях всего мира. При сравнительном анализе эффективности существующих тестов Европейской комиссией отмечено, что используемые в настоящее время в мировой практике 6 иммуноферментных тест-систем ИФА позволяют выявлять антитела к 24 серотипам вируса ВТ у экспериментально-зараженных овец — на 8-е сутки у овец и на 9-е сутки после инфицирования — у крупного рогатого скота [112].

В большинстве случаев все иммуноферментные тест-системы основаны на выявлении белка VP7 вируса ВТ, который, являясь группоспецифическим структурным белком-тримером, участвует в процессе проникновения вируса в клетку и поддержании инфекционности вируса в клетках насекомых-переносчиков [113]. За счет ранней гиперпродукции VP7 специфические антитела можно выявить в ИФА уже на пять-семьые сутки после заражения, что предопределяет эффективность метода [114].

Разработка тест-систем нового поколения позволила сократить сроки идентификации возбудителя до 2–3 часов, свести к минимуму сроки карантинирования животных и предотвратить занос возбудителей особо опасных инфекций с продуктами животноводства и племенным скотом [115].

Прогресс молекулярной биологии, особенно в разработке генетических зондов для гибридизационного анализа и методов полимеразной цепной реакции для обнаружения нуклеиновой кислоты вируса ВТ, дал наиболее эффективные диагностические результаты. ПЦР в реальном времени позволяет выявить наличие РНК вируса ВТ у экспериментально-зараженных овец на 3-и и у коров — на 2-е сутки после инфицирования [116].

Вирус блютанга может быть выделен из компонентов крови, главным образом из фракции эритроцитов, собранных у пораженных животных в период фебрильной реакции [117]. Сперма, собранная от самцов животных на пике виремии, или ткани от пораженных животных и плодов также могут быть использованы для выделения вируса ВТ.

Основной процедурой выделения вируса ВТ является инокуляция вируса куриным эмбрионам [118] или в клеточные культуры (например ВНК-21 или Vero). Вирус также можно выделить после ин-

трацеребрального заражения мышей. Для уточнения диагноза прибегают к постановке биопробы, заражая здоровую овцу внутривенно кровью подозрительного по заболеванию животного. Во всех случаях выделение вируса подтверждается серологическими методами. РИФ, РСК, РДП являются группоспецифическими методами и позволяют выявлять антитела к любому типу вируса блютанга; в РН и РПГА (реакция пассивной гемагглютинации) выявляют антитела к гомологичному типу вируса [119].

Вируснейтрализующие антитела выявляют в течение 12 месяцев. А комплемент-связывающие обнаруживаются на 10-й день после подъема температуры и сохраняются до 8 недель. Преципитирующие антитела достигают максимальных титров к 30-му дню после заражения и сохраняются в течение года после переболевания.

Реакция нейтрализации (РН) и ее микротитрационный вариант (РМН — реакция микронейтрализации) основаны на нейтрализации репродукции вируса блютанга в клеточных культурах антителами сыворотки. РМН является наиболее часто используемым методом анализа для выявления серотипспецифических антител к распознаваемым вариантам вируса ВТ. РМН может быть использована для типирования вирусных изолятов, а также для мониторинга популяции животных на наличие определенных серотипов вируса ВТ [120].

В дополнение к общепринятым методам, таким как выявление антигена с помощью флуоресцирующих антител и реакция нейтрализации для серотипирования изолятов вируса ВТ, иммуногистохимические, иммуноферментные и иммуноэлектронные микроскопические методы с использованием МАт предполагают более быстрые, специфические и чувствительные подходы к идентификации вируса и обнаружению антигена [121].

Кроме того, появление конкурентного ИФА, базирующегося на использовании моноклональных антител, решило проблему дифференциации вирусов ВТ от ЭГБО, а метод обнаружения специфических антител к вирусу блютанга различных серогрупп теперь рекомендован для референс-лабораторий всего мира [122].

**Постановка диагноза.** Диагноз на блютанг ставят по анализу эпизоотологических данных, симптомов болезни, патоморфологических изменений и результатам лабораторных исследований. Для окончательного диагноза проводят выделение вируса на эмбрионах, в культуре клеток или в биопробе.

Идентификация блютанга после инокуляции овцам является весьма результивным подходом, особенно если титр вируса в исследуемом образце очень низок. Попытки изолировать вирус в культурах клеток *in vitro* более удобны, но частота успеха намного ниже достигаемой в системе *in vivo*.

**Вирусовыделение.** Для исследования берут лимфатические узлы, селезёнку и кровь от больных или павших животных. В случае гибели животных селезенка и лимфатические узлы — оптимальные органы для выделения вируса. Пробы органов транспортируют в термосе при температуре (4±2)°С. Вирус неустойчив при долгом хранении при минус 20°C.

Для быстрого обнаружения вируса блютанга и его идентификации метод вирусовыделения обычно дополняют методом флуоресцирующих антител, что позволяет получить достоверный результат уже через 24–26 часов после инфицирования культуры клеток. При просмотре препаратов учитывают общее количество пораженных клеток, а также количество клеток, содержащих тельца-включения. Кроме того, обращают внимание на локализацию и структуру свечения, яркость и цвет люминесценции.

**Идентификация вируса методом электронной микроскопии** заключается в обнаружении методом негативного контрастирования при увеличении 40 000–80 000 раз вирусных частиц, морфологически сходных с вирионами рода *Orbivirus*, семейства *Reoviridae*, в культуральном и/или мозговом вируссодержащем материале.

Визуальная оценка морфологических особенностей вирионов согласуется с фотографическим атласом вирусов, поскольку вирионы представителей рода *Orbivirus*, семейства *Reoviridae* имеют типичную икосаэдрическую форму симметрии и размер 55–70 нм.

**Выявление вируса методом ТФ ИФА в сэндвич-варианте** проводят на основе использования моноклональных антител. Этот метод предназначен для выявления и идентификации группоспецифических антигенов вируса блютанга в мозговых материалах мышей, культуральной жидкости культур клеток, культуральных и мозговых антигенах, при выделении вируса на этих моделях, а также в пробах органов (селезенка и печень) и крови животных при поступлении патматериала.

**Определение серотипа вируса ВТ в реакции нейтрализации.** В реакции используют вирус с заведомо известным титром инфекционности, из которого готовят последовательные десятикратные разведения вируса. В пробирки вносят смесь, содержащую вирус и сыворотку в разведении 1:10–1:20. Одновременно ставят контроль вируса с нормальной сывороткой, контроль активности вируса, а также контроль интактной культуры клеток. Учет реакции осуществляют через 6 дней. Определяют индекс нейтрализации (максимальное количество инфекционных доз, которое нейтрализуется данной сывороткой, по сравнению с контролем, для которого он всегда равен 1). Индекс нейтрализации представляет собой

частное от деления ТЦД<sub>50</sub> вируса в смеси с нормальной сывороткой на ТЦД<sub>50</sub> в смеси с исследуемой сывороткой. Положительной считают реакцию с индексом нейтрализации 2 lg и более [123].

**Полимеразная цепная реакция.** В настоящее время метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) используется не только для обнаружения наличия нуклеиновой кислоты вируса, но и дает возможность определения его серотипа, возможного географического источника изолята блютанга (топотипа, или генотипа) в течение нескольких дней после получения клинического образца [124]. Традиционные подходы для изоляции вируса, сопровождаемые идентификацией вируса, требуют по крайней мере 2–4 недели на определение серогруппы и серотипа и не дают данных относительно возможного географического происхождения изолированного вируса.

По рекомендации МЭБ, для диагностики данной болезни используют стандартную ПЦР, причем анализ высококонсервативных участков генов VP3, VP6, VP7, NS1 и NS3 дает сведения о происхождении вируса ВТ, а VP 2 — о его серотипе [125, 126].

Расшифровка последовательности нуклеиновой кислоты указанных генов блютанга отличается географической областью изоляции [127] и обеспечивает уникальную возможность дополнительного изучения эпизоотологии блютанга. Таким образом, определение последовательности нуклеиновой кислоты 3 и 6 сегментов обеспечивает информацию: «прибыл» ли вирус из Австралии, Северной Америки или Южной Африки, что решает вопрос об их географическом происхождении [128].

**Дифференциальная диагностика.** Блютанг необходимо дифференцировать от ящура (высокая контагиозность, характерные ящурные поражения ротовой полости, вымени, конечностей, резуль-

таты вирусологических исследований), контагиозной эктимы овец (контагиозность, пустулезные поражения слизистых оболочек и кожного покрова, микроскопия мазков из патологического материала, биопроба на ягнятах и кроликах), злокачественной катаральной горячки (овцы болеют редко, заболевание в основном спорадическое, характерны поражения глаз и верхних дыхательных путей), некробактериоза (кроме овец болеют лошади, свиньи и другие животные, хроническое течение, выделение возбудителя), болезни Ибараки (болеет крупный рогатый скот, результаты вирусологических и серологических исследований), эпизоотической геморрагической болезни оленей (вирусологические и серологические исследования), а также от болезни Найроби и лихорадки долины Рифт. При современном развитии ПЦР-диагностики ее использование позволяет в кратчайшие сроки идентифицировать возбудитель болезни при неясной картине клинических и эпизоотологических данных [129].

**Серотипы вируса блутанга и типирование изолятов.** Вирус блутанга эндемичен в большинстве регионов с теплым климатом, включая территории Северной и Южной Америки, Африки, Индийского субконтинента (полуостров Индостан), Австралии и Азии. Изолятами и штаммами вируса ВТ, которые выделены во время вспышек болезни на этих территориях, имеют значительные генетические различия, в определенных случаях отражающие их географическое происхождение [127].

Для большинства штаммов и изолятов вируса ВТ наиболее значительные из этих изменений позволяют разделить все проанализированные генотипы вируса на восточные и западные группы или топотипы [126, 130]. Восточная группа включает изоляты Ближнего и Дальнего

Востока, Индийского субконтинента, Австралии, Китая и Малайзии, тогда как западная группа включает вирусы из Африки, Южной и Северной Америки.

Географическое разделение позволяет вирусам разных территорий приобретать и сохранять уникальные мутации, способствующие выживанию данного варианта в соответствующих локальных экосистемах. Процессы реассортации сегментов генома и их селекции постепенно приводят к появлению характерных территориально уникальных вариантов вируса. Уровень генетической дивергенции, выявленный у восточной и западной групп вируса, свидетельствует о том, что они в течение длительного периода времени циркулировали независимо друг от друга.

Вирус блутанга характеризуется существованием большого количества серотипов. Сначала Howell (1960) описал первые 12 и позже добавил еще 4 серотипа (13–16 серотипы). Интересно, что 17 серотип вируса ВТ был первоначально выделен в США, тогда как 18 и 19 серотипы — со вспышек блутанга в Южной Африке, 20 и 21 серотипы впервые выделены в Австралии [134, 135]. Следующие два серотипа 22 и 23 выделены от мокрецов рода Culicoides в Южной Африке и позже 23 серотип — от крупного рогатого скота в Австралии [136, 137, 138]. 24 серотип вируса ВТ выделен от овцы и мокрецов из Южной Африки [138, 139].

В 2008 г. опубликована статья о появлении нового вируса блутанга, который обнаружили у коз в Швейцарии, по результатам генетического анализа он был обозначен как 25 серотип [139, 140]. В 2010 г. другие исследователи обнаружили новый вирус у овец и коз в Кувейте, по результатам реакции нейтрализации и дальнейшего генетического анализа он был определен как 26 серотип [141], а в 2014 г. на острове

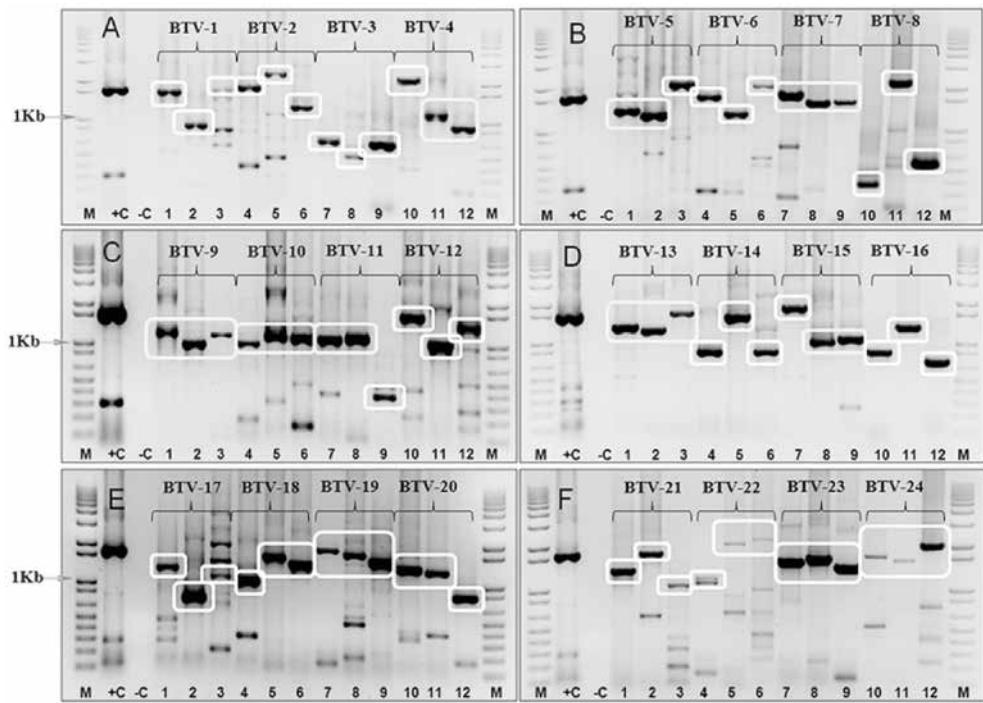


Рис. 11. Различия в подвижности ПЦР-продукта вируса блютанга 1–24 серотипов при электрофоретическом разделении в геле агарозы [144]

Корсики были выделены и охарактеризованы два новых варианта вируса BT 27 серотипа [142, 143].

В последующем было выявлено еще несколько новых предполагаемых серотипов, среди них вирус BT 28 серотипа, выделенный из вакцины против оспы овец на Ближнем Востоке [145], вирус BT 29 серотипа, обнаруженный у альпаки на юге Африки [146], а также, возможно, новые серотипы были обнаружены в Китае [147] и Италии [148].

В разных регионах отмечается совпадение определенных серотипов вируса с распределением различных видов переносчиков. Однако не все серотипы привязаны к какой-либо одной географической области; например, 13 серотипов (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 22 и 24) были зарегистрированы в США и 8 серотипов (1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 и 16) — в Европе. Распространение вируса BT

по всему миру аналогично пространственному и временному распределению векторных видов мокрецов *Culicoides*, которые являются единственным значительным переносчиком вируса, и зависит от температур, при которых вирус BT будет реплицироваться и передаваться этими векторами. Известно более 1400 видов *Culicoides* во всем мире, но на сегодняшний день менее 30 определены как фактические или потенциальные переносчики вируса BT.

Продолжающаяся циркуляция вируса в популяции мокрецов *Culicoides spp.* и восприимчивых жвачных животных имеет решающее значение для вирусной экологии. В США основными переносчиками являются *C. sonorensis* и *C. insignis*, которые ограничивают распространение вируса BT в южных и западных регионах. В северной и восточной Австралии основным перенос-

чиком является *C. brevifarsis*, тогда как в Африке, на юге Европы и на Ближнем Востоке — *C. imicola*. В северной Европе основными переносчиками являются виды *C. obsoletus-dewulfi*. Однако в каждом географическом регионе вторичные переносчики могут также иметь локальное значение [149].

Таким образом, на настоящий момент у вируса ВТ известно 29 серотипов, определенных специфичностью взаимодействий между белками на поверхности капсида вируса, вовлеченными в процесс прикрепления к клетке и проникновения и нейтрализующими антителами хозяина-млекопитающего [150]. Распространение серотипов и их количество варьирует в зависимости от географической локализации. Большинство серотипов вируса ВТ обнаружили в Африке и на полуострове Индостан, остальные — в других частях Азии, Австралии, Южной и Северной Америки.

Эпизоотология и меры борьбы с блютангом. Проблема блютанга продолжает привлекать пристальное внимание ветеринарных специалистов [1, 151, 152, 153] в связи с широким географическим распространением болезни в мире и, в частности, в Европе. Так, по данным МЭБ и Нотификационной системы ЕС по болезням животных, только в европейских странах отмечено появление очагов блютанга в Албании, Болгарии, Боснии и Герцеговине, Греции, Испании, Италии, Македонии, Румынии, Сербии и Турции [154, 155]. Но прежде всего интерес к болезни связан с беспрецедентным расширением нозоареала блютанга из эндемичных регионов Африки и Азии в северном направлении, когда граница ареала от привычных 40° с.ш. сдвинулась до 58° с.ш. (Швеция, Норвегия).

Новое проникновение вируса блютанга различных серотипов в европейские страны отмечено с октября 1998 г.,

а в 2006 г. вирусом блютангом 8-го серотипа были поражены практически все страны Северо-Западной Европы [156]. Пик интенсивности проявления болезни пришелся на 2007–2008 гг., когда было выявлено более 60 тысяч очагов. Массовые вспышки болезни регистрировались и в последующие годы, но уже в 2011 г. было выявлено всего лишь 39 очагов болезни (Греция, Италия, Испания, Португалия, Кипр) [157, 158].

Что касается вируса серотипа 14, который получил распространение в ряде стран Европы в 2011–2012 гг., то представители референтных лабораторий по блютангу (Пербрейт, Великобритания; Испания; Россия) считают, что выделенные штаммы являются реассортантами, содержащими геномные сегменты различных референтных вакцинных штаммов, происходящих из Южной Африки [159].

Очевидно, что на начало XXI столетия сохраняется актуальность в изучении эпизоотологии, совершенствовании средств и методов диагностики, специфической профилактики и мер борьбы с особо опасными экзотическими болезнями животных, такими как блютанг. Экономический ущерб от блютанга в первичном очаге составляют прямые потери (гибель и вынужденный убой животных) и затраты на проведение противоэпизоотических мероприятий; в стационарных — прямые потери, снижение продуктивности домашних жвачных, нарушение воспроизводства, а также ограничения на экспорт сельскохозяйственной продукции, в частности на торговлю скотом, мясом, шерстью и другими продуктами животного происхождения [160].

Анализ эпизоотической ситуации по блютангу в мире за последние годы [161] свидетельствует о том, что ареал инфекции постоянно расширяется. По данным МЭБ, к 1967 г. болезнь реги-

стрировали в 13 странах Африки, спустя 10 лет — в 80 странах Западного и Восточного полушария, а к началу XXI столетия — более чем в 90 странах (см. таблицу).

В 1996–2006 гг. болезнь приобрела новые масштабы и зарегистрирована в Австралии, Океании (3 страны), Северной Америке (2 страны), Центральной Америке (15 стран), Южной Америке (9 стран), Африке (20 стран), Азии (23 страны и территории), в Европе (12 стран). С 1998 г. ситуация характеризуется экстремальным усилением эпизоотической напряженности, сопровождавшейся регистрацией тысяч вспышек, массовой заболеваемостью, падежом и вынужденным убоем сотен тысяч голов овец, крупного рогатого скота, а также верблюдов и диких жвачных. С наибольшей интенсивностью она проявилась в регионе африканского и евразийского Средиземноморья. Эпизоотии впервые наблюдали в таких ранее благополучных странах, как Италия, Франция, Болгария, Албания, Босния и Герцеговина, Сербия, Черногория. Эпизоотия блютанга в странах Средиземноморья в 1998–2004 г. сопровождалась падежом и вынужденным убоем более 500 тыс. голов овец. В августе 2006 г. болезнь распространилась в странах Центральной и Западной Европы: Бельгии, Германии, Нидерландах, а также в Польше, куда возбудитель был занесен с импортированным скотом [162].

Важной эпизоотологической особенностью блютанга, значительно усложняющей борьбу с болезнью, является способность вируса формировать природные очаги даже при однократном его заносе на определенную территорию. Это объясняется тем, что возбудитель может длительно персистировать в организме жвачных, сохраняться в организме кровососущих насекомых и передаваться трансфазно в течение

нескольких поколений переносчиков [163, 164]. Переболевшие овцы приобретают пожизненный иммунитет только к тому серотипу вируса, который вызвал болезнь. Возможна реинфекция возбудителем другого типа в течение того же сезона или на следующий год. Активный иммунитет у реконвалесцентов сопровождается образованием вируснейтрализующих и комплемент-связывающих антител.

Наиболее значимым резервуаром вируса в дикой природе являются лоси, антилопы, белохвостые олени, некоторые грызуны, на которых в основном питаются мокрецы. По данным Osburn B.I. и соавт., в Орегоне и Калифорнии из 1295 проб крови было выделено на культуре клеток Vero 214 изолятов вируса блютанга, в том числе 15,9% изолятов от КРС, 22,1% — от овец, 5,5% — от кошек и 2,7% — от антилоп [166]. В стадах сельскохозяйственных животных резервуаром вируса блютанга является крупный рогатый скот. Длительная вирусемия (до 3 лет) обеспечивает переживание возбудителя в межэпизотический период, способствуя формированию стационарных очагов в хозяйствах. Установлена также вертикальная передача вируса от матери к плоду. Вирус содержится в крови и кроветворных органах больных животных.

Заболеваемость блютангом носит сезонный характер и совпадает с периодом наибольшей активности насекомых. Основным биологическим переносчиком, в организме которого вирус размножается, является *Culicoides variipennis*, распространяющий как патогенный, так и вакцинный вирус блютанга. К переносчикам возбудителя блютанга относят и несколько других видов мокрецов (род *Culicoides*) (рис. 6г), комаров (*Culex Aedes*) (рис. 6б и 6в), кошарных клещей (*Ornithodoros*) и овечьих кровососок *Melophagus ovinus* (рис. 6а) [138, 165]. Ви-

рус ВТ передается от больных животных здоровым кровососущими насекомыми — достаточно 0,01 мл крови, содержащей вирус в небольших количествах 1–2lg, чтобы вызвать болезнь [167]. Передача вируса блютанга происходит, как правило, через укусы самок определенных видов мокрецов. Однако наблюдают длительные периоды отсутствия переносчиков, которые превышают максимальную длительность виремии у жвачных животных. Это происходит при неблагоприятных для мокрецов климатических условиях, например во время засухи, а также в зимний период. При отсутствии переносчиков вспышки ВТ прекращаются. Обычная схема передачи вируса ВТ предполагает, что если период отсутствия переносчиков длится более 100 дней, то вирус не сможет сохранить свою инфекционную активность, т.е. «пережить» этот период [168].

Не исключено, что передача вируса за пределами первичного ареала может осуществляться другими механическими переносчиками. Распространению болезни могут способствовать птицы, перенося на себе кровососущих насекомых, ранее кормившихся на больных животных. Они могут являться промежуточным звеном, которое осуществляет непрямую трансмиссию вируса от вирусоносителей к восприимчивым животным. Этот факт, возможно, объясняет нередко внезапное начало некоторых эпизоотий. Так, в Нидерландах после эпизоотии 2006 года ВТ вновь появился в 2007 году, что совпало с периодом максимального лета переносчиков [169].

Возможными путями сохранения вируса блютанга в межэпизоотический период могут быть:

1. *Сохранение в переносчиках* — переживание во взрослых мокрецах. Взрослые

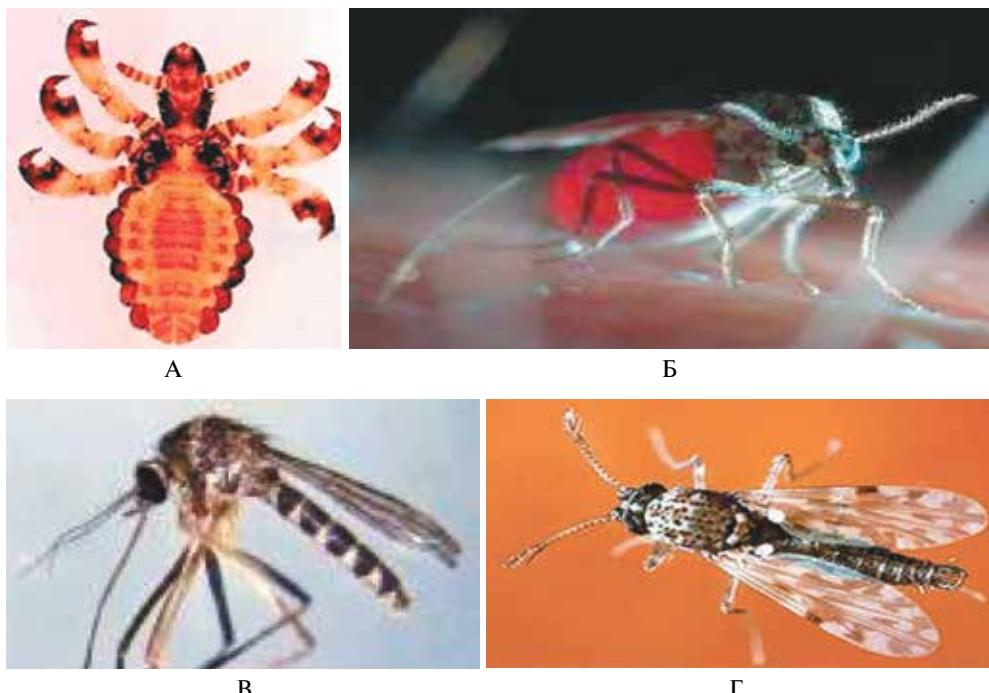


Рис. 12. Переносчики возбудителя блютанга

мокрецы *Culicoides* при температурах, близких к нулевым, выживают не более 10–20 дней. Однако существует возможность выживания небольшой части зараженных вирусом блютанга мокрецов при умеренных температурных условиях зимы. Хотя большинство европейских видов мокрецов не обитают в зданиях, в ряде исследований установлено, что часть насекомых переживает период пониженных температур в закрытых помещениях и остаются активными в течение зимы. Поэтому круглогодичное существование зараженных мокрецов может служить вероятным объяснением цикла передачи вируса блютанга.

Отмечается, что нуклеиновая кислота блютанга может выявляться методом ПЦР в крови инфицированных телят и овец в течение 30 дней, иногда и более чем 90 дней. Однако при инокуляции мокрецов *Culicoides variipennis* кровью животных, положительной при изоляции вируса, и кровью, отрицательной при изоляции вируса, но положительной в ПЦР, позволило установить, что вирус передавался только насекомыми, получившими инфицированную кровь. Мокрецы, получившие только ПЦР-положительную кровь, не передавали вирус блютанга, поскольку ПЦР обнаруживает только специфическую нуклеиновую кислоту вируса, но это не обязательно указывает на присутствие инфекционного вируса [170].

2. **Сохранение в переносчиках** — при трансовариальной передаче вируса от зараженных мокрецов потомству. Тем не менее большинство *Culicoides* переживает неблагоприятный период на стадии личинки [171]. Не описано ни одного случая удачного выделения инфекционного вируса ВТ из личинок или взрослых особей, родившихся от инфицированных мокрецов, хотя у них и выявляли фрагменты РНК, что объясняется проникновением лишь фрагментов РНК в

развивающееся яйцо, а не цельных вирионов. Следовательно, данный механизм передачи вируса до настоящего времени пока не имеет подтверждения.

3. **Сохранение в переносчиках** — наличие альтернативных переносчиков. Другие переносчики вируса блютанга, помимо мокрецов *Culicoides*, также могут играть роль в сохранении вируса. Так, клещи, которые могут являться биологическими переносчиками вируса ВТ, живут в течение нескольких лет. Кроме того, механическим переносчиком вируса ВТ являются бескрылые мухи *Melophagus ovinus*, живущие в шерсти овец.

4. **Сохранение в животных** подразумевает у них длительную персистенцию вируса. Инфекционный вирус ВТ при экспериментальном и естественном заражении может быть выделен из крови КРС дольше, чем от овец и коз, но, как правило, не более 58 дней. Однако некоторые ученые предполагают, что у отдельных особей вирус может сохраняться намного дольше. Например, есть свидетельства о кормлении больших количеств незараженных мокрецов на переболевших коровах, после чего произошла стимуляция репродукции вируса в различных клетках кожи в месте воспаления. Аналогичные эксперименты на овцах позволяли выделить вирус из кожи животного в течение более двух месяцев после заражения [169]. *In vitro* показана возможность сохранения вируса в Т-клетках, что позволило бы объяснить длительную персистенцию вируса в организме животного с периодами отсутствия вируса в крови и последующими периодами виремии в летний период при появлении мокрецов, их многочисленных укусах и развитии кожной воспалительной реакции. Такой механизм позволял бы вирусу сохраняться в течение нескольких месяцев без заражения новых хозяев и переживать периоды отсутствия переносчиков.

**5. Сохранение в других видах животных** — резервуаром вируса ВТ может являться пока еще неизвестный хозяин с длительным периодом виремии при отсутствии или слабо выраженных клинических признаках. При этом продолжительность виремии у инфицированных блютангом диких жвачных животных мало изучена. У белохвостых оленей и лосей виремия при инфицировании вирусом ВТ не превышает 16 дней [172], у бизонов — 28 дней. Однако предполагается, что виремия у них может продолжаться до трех месяцев после инфицирования [173].

**6. Сохранение в животных** — посредством передачи вируса между жвачными половым путем. Есть сообщения о выделении вируса БТ со спермой у лабораторно инфицированных быков. Данные исследований показывают, что это происходит только в период виремии [174]. В настоящее время, как правило, используется искусственное осеменение спермой от быков-производителей, проверенных на основные инфекционные заболевания, в том числе и на блютант. Поэтому данный путь передачи не может играть существенной роли в эпизоотологии блютанга.

**7. Сохранение в животных** — вертикальная трансплацентарная передача вируса ВТ описана как у КРС, так и у овец после заражения адаптированными к культуре штаммами различных серотипов. Трансплацентарная передача вируса ВТ впервые зарегистрирована в 1970 годах, в случае вируса ВТ 8 серотипа трансплацентарную передачу наблюдали как у естественно, так и у экспериментально инфицированных животных [175].

**Профилактика.** В настоящее время вакцинопрофилактика блютанга детально разработана и эффективно применяется. Как правило, ее основой служат инактивированные вакцины из определенного серотипа. Поскольку всегда существует

возможность рекомбинации между вакцинным и циркулирующим вирулентным вариантами, использование живой аттенуированной вакцины нецелесообразно и опасно [176, 177]. Вакцина против данного заболевания должна предохранять животных от заражения всеми серотипами этого вируса, циркулирующими в регионе, она не должна вызывать клинических симптомов болезни у привитых особей, реверсировать и проявлять иммунологическую интерференцию. Кроме того, необходимо иметь возможность дифференциации вакцинированных животных от зараженных [178].

Поскольку переболевшие животные приобретают пожизненный иммунитет к типу вируса, вызвавшего заболевание, учитывается возможность реинфекции животного другим типом вируса [179, 180]. Ягнята и телята, родившиеся от иммунных маток, также приобретают пассивный иммунитет продолжительностью до 3 месяцев.

За рубежом разработаны поливалентные живые и инактивированные вакцины против блютанга [181, 182, 183, 184].

Для иммунизации овец в Южной Африке в течение 40 лет применяли ослабленный вирус (вакцина Тейлора), затем в 1947 г. Александр предложил поливалентную вакцину из четырех штаммов вируса, аттенуированного путем серийных пассажей на куриных эмбрионах. Эту вакцину успешно применяли для ликвидации эпизоотии блютанга в 1956 г. в Португалии и Испании.

Для различных видов животных также описан ущерб от применения живых вакцин против ВТ; так, иммунизация беременных собак после введения вакцины привела к abortам, сердечной недостаточности, дыхательной недостаточности и смерти. Кроме того, живой ослабленный вирус вакцины против ВТ переходит плацентарный барьер и приводит к abortам [182].

Более того, в референтной лаборатории в Пербрайте подтвердили инфицированность животных в Польше, Латвии и Литве вирусом блютанга 14-го серотипа, который был идентичен на 100% референтному вакцинному штамму BTV-14 South Africa, входящему в состав коммерческой мультивалентной аттенуированной вакцины, выпускаемой предприятием Ondersteoort Biological Products (OBP — South Africa), и на 99,9% соответствовал российскому штамму RUS2011/01, выделенному в Смоленской области [39, 40].

В последние годы в ЮАР изготовлена вакцина из 14 антигенно различающихся типов вируса, разработанная на основе использования культуры клеток почек ягнят и КРС для размножения вируса.

**В России** также разработаны и испытаны инактивированные вакцины против различных серотипов вируса блютанга: вакцина против 16 серотипа вируса успешно применена в Бурятии при ликвидации вспышки в 1993 г., а также поливалентная вакцина против трех серотипов 4, 8, и 9 [185, 186].

Вакцинацию проводят в начале лета введением подкожно в дозе 1–2 мл. Рекомендуется в течение последующих двух недель содержать животных в затемненном помещении, без выгона на пастбище.

Однако эффективной защиты от вируса блютанга не всегда удается достичь одноразовой иммунизацией. Чтобы избежать вирусоносительства в результате поствакцинального инфицирования, необходимо использовать дозу иммунизирующего протективного антитела в 5–10 раз выше дозы, рекомендуемой для предотвращения заболевания.

Подобный эффект позволяют достичь рекомбинантные вакцины [187, 188]. На настоящий момент фирмой Alvac разработаны вакцины на основе рекомбинантного поксвируса против 3 серо-

типов блютанга. Их двукратное применение позволяет достичь стерильного иммунитета к определенным серотипам вируса блютанга [189].

**Меры борьбы** с блютангом основаны на знании особенностей эпизоотологии этой болезни, таких, как ее стационарность, сезонность, трансмиссионный путь передачи возбудителя инфекции, и существовании множества серотипов возбудителя. В угрожаемой зоне и стационарных очагах систематически проводят борьбу с переносчиками, запрещают пастьбу вечером, в период массового лёта насекомых животных перегоняют с забоченных пастбищ на более сухие [153].

В благополучных по болезни странах профилактические мероприятия ограничиваются запрещением ввоза восприимчивых животных из неблагополучных по блютангу стран, карантинированием домашних и диких жвачных в местах ввоза с обязательным исследованием сывороток. В неблагополучных по данной болезни странах мира мероприятия по профилактике и ликвидации блютанга проводят по общей схеме: убивают больных и подозреваемых в заражении животных в первичном очаге; вакцинируют жвачных в угрожаемой зоне; уничтожают кровососущих насекомых-переносчиков в помещениях и в природе [190]. Однако в Австралии программа борьбы с блютангом основана на поголовной вакцинации восприимчивых животных, даже несмотря на обнаружение носительства вируса у переносчиков [191].

В СССР и Российской Федерации до 1992 г. эпизоотических вспышек болезни среди восприимчивых животных не регистрировали. Однако начиная с 2006 г. актуальность изучения блютанга для РФ резко возросла в связи с импортированием племенного КРС из стран Европейского союза, неблагополучных на тот момент по блютангу — Германии,

Голландии и др. [192]. За период с 2006 по 2015 гг. было ввезено более 610 тыс. коров.

Кроме того, в последние десятилетия наблюдается тенденция к расширению ареалов трансмиссивных инфекций, в том числе и блютанга, что делает актуальным вопрос изучения как возбудителей данных болезней, так и их переносчиков. Сложившаяся ситуация усугубляется мировым изменением климатических условий, способствующих распространению векторов-переносчиков на новые территории и увеличению численности насекомых. Следствием этого может быть проникновение патогенов в умеренные климатические пояса обоих полушарий и рост количества вспышек в эндемических очагах [153, 158].

Четкое знание мировой эпизоотической обстановки по блютангу необходимо, так как блютанг может быть занесен в Россию не только из стран Евросоюза, но и из стран Центрально-Азиатского и Дальневосточного регионов [193, 194]. Кроме того, на территории России есть все условия для его «укоренения». Прежде всего это наличие различных видов мокрецов (*C. dewulfi*, *C. obsoletus*, *C. pulicaris* и др.), потенциальных резервуаров и переносчиков вируса ВТ [195].

В целом необходима строгая целенаправленная система, предусматривающая комплекс мер по недопущению заноса болезни, включающих раннюю диагностику, четкие схемы мониторинга и надзора, эффективные противоэпизоотические мероприятия. Согласно «Санитарному кодексу наземных животных МЭБ», основными методами диагностики блютанга при экспорте животных являются ИФА и ОТ-ПЦР [196, 197]. Одним из достоинств ПЦР-анализа является обнаружение вирусного генома у животных начиная с первых дней заболевания, когда еще не сформировался иммунный ответ

организма [198]. Таким образом, при ввозе животных из неблагополучных стран или зон, а также в ходе проведения противоэпизоотических мероприятий при вспышках блютанга требуется проведение быстрых и эффективных лабораторных исследований, позволяющих в кратчайшие сроки выявить возбудитель. Метод ПЦР в режиме реального времени позволяет получить результат в 2–3 раза быстрее по сравнению с классической ПЦР и проводить количественную оценку динамики накопления целевого продукта с автоматической регистрацией результатов, а также снижает риск контаминации и позволяет использование внутреннего контроля, что, согласно рекомендациям МЭБ (OIE, 2008), является необходимым условием при создании тест-систем на основе ПЦР.

Решающее значение при ликвидации блютанга имеют мероприятия, проводимые в угрожаемой зоне. Для предотвращения распространения блютанга из первичного очага необходимо определить угрожаемую зону — территорию, на которой обитают восприимчивые к заражению виды животных, и прилегающую к эпизоотическому очагу местность. Размер угрожаемой зоны определяют расстоянием миграции диких жвачных или летающих мокрецов (100–150 км от эпизоотического очага с учетом розы ветров). В ней организуют постоянное наблюдение за восприимчивыми животными, включая систематический клинический осмотр поголовья и регулярное проведение серологических исследований на блютанг не менее 0,5% поголовья мелких и крупных жвачных. Локализовать первичный очаг блютанга возможно только при своевременной иммунизации всех клинически здоровых жвачных животных в угрожаемой зоне вакциной, изготовленной на основе выделенного в эпизоотическом очаге

серотипа вируса, а также проведением мероприятий по борьбе с насекомыми-переносчиками [199].

Ограничения с неблагополучного хозяйства снимают через год после последнего случая заболевания и уничтожения больных особей при получении отрицательных результатов исследований на бессимптомное вирусоносительство [200].

В настоящий момент для минимизации риска заноса и исключения возможности распространения блютанга на территории Российской Федерации необходимо ввести запрет на ввоз скота из неблагополучных по блютангу регионов, проводить серологическое обследование всего скота, ввозимого из граничащих с неблагополучными и подозреваемых в неблагополучии по блютангу стран. При возникновении подозрения на блютанг немедленно информировать об этом государственную ветеринарную службу региона и направить пробы патологического материала для исследования на блютанг; при появлении блютанга действовать согласно «Временной инструкции о мероприятиях по борьбе с катаральной лихорадкой овец», утвержденной ГУВ МСХ СССР от 27 марта 1974 г.

## Литература

1. Сюрин В.Н. и др. Вирусные болезни животных. М. ВНИТИБП. 1998; 770–777.
2. Василенко Н.З. Инфекционная катаральная лихорадка овец. Малоизвестные заразные болезни животных. М.: Колос. 1973; 103–114.
3. Катаральная лихорадка овец (блютанг). Четыре десятилетия на переднем крае борьбы с особо опасными болезнями животных. Под ред. И.А. Бакулова. Владимир. Посад. 1998; 60–62. 178. 184–187.
4. Gutsche T. There was a man. Timmins. Cape Town. 1979; 4.
5. Hutcheon D. Malarial catarrhal fever of sheep. Vet Rec. 1902; 14: 629–633.
- Hutcheon D. Malarial catarrhal fever of sheep. Vet. Rec. 1992; 14: 629–633.
6. Spreull J. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. J. Comp. Pathol. Ther. 1905; 18: 321–337.
7. McKercher D.G., McGowan B., Howarth J.A., Saito J.K. A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1953; 122: 300–301.
8. Alexander, G.I. Bluetongue research in Australia. 1993. Alexander G.I., Gpgard G. Australian Veterinary Journal. 1994; 71(6): 182–183.
9. St George T.D., Standfast H.A., Cybinsski D.H. et al. The isolation of bluetongue virus from Culicoides collected in the Northern Territory of Australia. Aust. Vet. J. 1978; 54: 153–154.
10. Gambles R.M. Bluetongue of sheep in Cyprus. J. Comp. Pathol. 1949; 59: 176–190.
11. Komarov A., Goldsmit L. A disease similar to bluetongue in cattle and sheep in Israel. Refuah. Vet. 1951; 8: 96–100.
12. Shimshony A. Bluetongue in Israel — a brief historical overview. Vet. Ital. 2004; 40(3): 116–8.
13. Бакулов И.А., Котляров В.М., Донченко А.С., Хухоров И.Ю., Терновая С.Ф., Кнize А.В. Особо опасные болезни животных. Справочник. Покров-Новосибирск. 2002; 99–109.
14. Сергеев В.А. Катаральная лихорадка овец. Карантинные и малоизученные болезни животных. М.: Колос. 1983; 63–71.
15. Ostlund E.N., Moser K.M., Johnson D.J., Pearson J.E., Schmitt B.J. Distribution of bluetongue in the United States of America 1991–2002. Vet. Ital. 2004; 40(3): 83–88.

16. Clavilo A. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet. Rec.* 2002; 151(10): 301–302.
17. Taylor W.P. The epidemiology of Bluetongue. *Rev. sci. tech. Off int. Epiz.* 1986; 5(2): 351–356.
18. Gomez-Tejedor C. Brief overview of bluetongue situation in Mediterranean Europe 1998–2004. *Vet. Ital.* 2004; 40(3): 57–60.
19. Mellor P.S., E. Wittmann. Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. *Vet. J.* 2002; 164: 20–37.
20. Osborn B.I., McGowan B., Heron B., Loomis E., Bushnell R., Stott J., Utterback W. Epizootiologic study of bluetongue: virologic and serologic results. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 42: 884–887.
21. Bluetongue in Bulgaria, Office International des Epizooties (OIE)/. OIE Disease Information. 2006. [www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS\\_74.HTM#Sec8](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_74.HTM#Sec8).
22. Bluetongue in Bulgaria: additional information. Anon. Dis. Info. 1999; 12: 122.
23. Bluetongue in Croatia: suspected outbreak. Anon. Dis. Info. 2001; 14: 262–265.
24. Bluetongue in France: in the island of Corsica. Anon. Dis. Info. 2000; 13: 195–197.
25. Bluetongue in Greece and Italy. Anon. Dis. Info. 2001; 14: 215–218.
26. Bluetongue in Greece: confirmation of diagnosis. Anon. Dis. Info. 1998; 11: 166–167.
27. 2Bluetongue in Greece: follow-up report no. 2. Anon. Dis. Info. 2001; 14: 262–265.
28. Bluetongue in Kosovo (FRY), territory under United Nations interim administration. Anon. Dis. Info. 2001; 14: 242–243.
29. Kirkland P.D., Zhang N., Hawkes R.A. et al. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China. *Epidemiol. Infect.* 2002; 128(2): 257–263.
30. Daniels P.W., Sendow I., Pritchard L.I., Sukarsih and Eaton B.T. Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. *Vet. Ital.* 2004; 40(3): 94–100.
31. Макаров В.В., Шоопала Д., Джупина С.И., Сухарев О.И. Блютанг в начале 21 века: реальная эпизоотология. *Ветеринария сегодня.* 2013; 1: 8–10.
32. Вишняков И.Ф., Стрижаков А.А. и др. Вспышка катаральной лихорадки овец в Бурятии. *Ветеринария.* 1995; 4: 7–8.
33. Bluetongue / OIE. Terrestrial Animal Health Code. 23th ed. Chapter 8.3. Paris. 2014.
34. EC. Animal Health and Welfare. URL:[http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BT\\_germany\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BT_germany_report.pdf).
35. EC. Animal Health and Welfare. URL: [http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BTbelgium\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BTbelgium_report.pdf).
36. Bluetongue. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.1.3. URL: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.03\\_BLUETONGUE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf).
37. Panferova A., Koltsov A. et al. Detection of Bluetongue outbreak in Smolensk region of Russia in 2011. 6th Annual Meeting EPIZONE “Viruses on the move”. Abstracts. Brighton. UK. 2012; 23.
38. Куринов В.В. и др. Эффективность контроля блютанга при экспорте-импорте животных из стран с неблагополучным статусом зон. *Ветеринария сегодня.* [http://www.kubanvet.ru/journal\\_n4\\_20127.html](http://www.kubanvet.ru/journal_n4_20127.html)
39. Maan S., Maan N.S., Samuel A.R., O’Hara R., Meyer A.J., Rao S. & Mertens P.P.C. Completion of the sequence analysis and comparisons of genome segment 2 (encoding outer capsid protein VP2) from representative isolates of the 24 bluetongue virus serotypes. *Vet. Ital.* 40 (4): 484–488.

40. Захаров В.М., Кононов А.В., Мищенко В.А. О случаях выявления вакциноподобного вируса блютанга 14-го серотипа в РФ и в странах Европы в 2011–2012 гг. Ветеринария сегодня. 2015; 1: 15–19.
41. Abdallah M. Samy, Townsend Peterson A. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of Bluetongue Virus. PLOS ONE. March 9. 2016; DOI:10.1371/journal.pone.0150489.
42. Захаров В.М., Гуленкин В.М., Караполов А.К., Дудников С.А. Распространение блютанга в Европе и его реальная угроза для животноводства России. Российский ветеринарный журнал. 2007; 4: 4–6.
43. Guyot H., Mauroy A., Kirschvink N., Rollin F., Seagerman C. Clinical aspects of bluetongue in ruminants. Bluetongue in northern Europe. 2008; 34–53.
44. Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H. Orbiviruses, Reoviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., editors. Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London. Elsevier. Academic Press. 2005; 466–483.
45. Osburn B.I. Bluetongue virus Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 1994; 10(3): 547–550.
46. Roy P. Review article Bluetongue virus proteins. Journal of General Virology. 1992; 73: 3051–3064.
47. Verwoerd D.W., Els H.J., De Villiers E.M., Huismans H. Structures of the bluetongue virus capsid. J. Virol. 1972; 10: 783–794.
48. Mertens P.P.C., Burroughs J.N., Anderson J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. Virology. 1987; 157: 375–386.
49. Huismans H., Van Dijk A.A., Els H.J. Uncoating of parental bluetongue virus to core and subcore particles in infected L cells. Virology. 1987c; 157: 180–188.
50. Huismans H., Van der Walt N.T., Cloete M., Erasmus B.J. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. Virology. 1987a; 157: 172–179.
51. Mertens P.P.C., Diprose J., Maan S., Singh K.P., Attoui H. and Samuel A.R. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. Vet. Ital. 2004; 40(4): 426–437.
52. Borsig J., Morash B.D., Sargent M.D., Copps T.P., Lievaart P.A., Szekely J.G. Two modes of entry of reovirus particles into L cells. J. Gen. Virol. 1979; 45: 161–170.
53. Bowne J.G., Jochim M.M. Cytopathologic changes and development of inclusion bodies in cultured cells infected with bluetongue virus. Am. J. Vet. Res. 1967; 28: 1091–1105.
54. Lecatsas G. Electron microscopic study of the formation of bluetongue viruses. Onderstepoort. J. Vet. Res. 1968; 35: 139–149.
55. Mertens P.P.C., Attoui H. The RNAs and proteins of dsRNA viruses. Available. 2011c; 55 [http://www.reoviridae.org/dsRNA\\_virus\\_proteins/ReoID/virus-nos-by-country.htm](http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/ReoID/virus-nos-by-country.htm). Accessed 2011 Oct9.
56. Joklik W.K. Structure and function of the reovirus genome. Microbiol. Rev. 1981; 45: 483–501.
57. Verwoerd D.W., Louw H., Oellermann R.A. Characterization of bluetongue virus ribonucleic acid. J. Virol. 1970; 5: 1–7.
58. Mertens P.P.C., Brown F., Sangar D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. Virology. 1984; 135: 207–217.
59. Wu X., Chen S.Y., Iwata H., Compans R.W., Roy P. Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of bluetongue virus. J. Virol. 1992 Dec; 66(12): 7104–7112.

60. Peter P.C. Mertens The Molecular Epidemiology of Bluetongue Virus, European Community Reference Laboratory for Bluetongue virus, Institute for Animal Health Pirbright. UK.
61. Mertens P.P.C., Brown F., Sangar D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* 1984; 135: 207–217.
62. Verwoerd D.W., Huismans H. Studies on the *in vitro* and the *in vivo* transcription of the bluetongue virus genome. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1972; 39: 185–191.
63. H. Huismans, A.A. Van Dijk. Bluetongue Virus Structural Components. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1990; 162: 21–41.
64. Urakawa T., Ritter D.G., Roy P. Expression of largest RNA segment and synthesis of VP1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: association of VP1 protein with RNA polymerase activity. *Nucleic Acids. Res.* Sep. 25. 1989; 17(18): 7395–7401. doi: 10.1093/nar/17.18.7395.
65. Roy P. Bluetongue virus genetics and genome structure. 1989.
66. Huismans & van Dijk. Bluetongue virus structural components. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990; 162: 21–41. doi: 10.1007/978-3-642-75247-6\_2.
67. Prasad B.V.V., Yamaguchi S., Roy P. Three-dimensional structure of single-shelled bluetongue virus. *Journal of Virology*. 1992a; 66: 2135–2142.
68. Cleveland N.R., Zarbl H. & Millward S. Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2. *Journal of Virology*. 1986; 60: 307–311.
69. Liu M., Mayrion N. R. & Estes M. K. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*. 1992; 188, 77–84.
70. Mertens P.P.C., Burroughs J.N., Anderson J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology*. 1987; 157: 375–386.
71. Roy P., Adachi A., Urakawa T., Booth T.F. & Thomas C.P. Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. *Journal of Virology*. 1990; 64: 1–8.
72. Fukusho A., Yu Y., Yamaguchi Y. & Roy P. Completion of the sequence of bluetongue virus serotype 10 by the characterization of a structural protein, VP6, and a non-structural protein, NS2. *Journal of General Virology*. 1989; 70: 1677–1689.
73. Yu, Y., Fukusho, A., Ritter, D. G. & Roy, P. (1988). Complete nucleotide sequence of the group-reactive antigen VP7 gene of bluetongue virus. //Nucleic Acids Research 16, 1620.
74. Smilowitz H., Carson J. & ROBBINS p. w. Association of newly synthesized major f1 coat protein with infected host cell inner membranes. *Journal of Supramolecular Structure*. 1972; 1: 8–18.
75. Kowalik T.F. & Li J.K.K. Bluetongue virus evolution: sequence analyses of the genomic S1 segments and major core protein VP7. *Virology*. 1991; 187: 749–755.
76. Iwata H., Chuma T. & Roy P. Characterization of genes encoding two of the major capsid proteins of epizootic haemorrhagic disease virus indicates a close genetic relationship to bluetongue virus. *Journal of General Virology*. 1992; 73: 915–924.
77. Inumaru, S., Ghiasi H. & Roy, P. Expression of bluetongue virus group-specific antigen VP3 in insect cells by a baculovirus vector: its use for detection of bluetongue virus antibodies. *Journal of General Virology*. 1987; 68: 1627–1635.
78. Oldfield S., Adachi A., Urakawa T., Hirasawa T. & Roy P. Purification and characterization of the major groupspecific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology*. 1990; 71: 2649–2656.

79. Chuma T, le Blois H., Sanchez-Vizcaino J.M., Diaz-Laviada M. & Roy P. Expression of the major core antigen VP7 of African horsesickness virus by a recombinant baculovirus and its use as a group-specific diagnostic reagent. *Journal of General Virology*. 1992; 73: 925–931.
80. Huismans H. & Erasmus B.J. Identification of the serotypespecific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1981; 48: 51–58.
81. Kahlon J., Sugiyama K. & Roy P. Molecular basis of bluetongue virus neutralization. *Journal of Virology*. 1983; 48: 627–632.
82. Cowley J.A. & Gorman B.M. Genetic reassortments for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. *Journal of Virology*. 1987; 61: 2304–2306.
83. Roy P., Marshall J.J.A. & French T.J. Structure of bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1990b; 162: 43–87.
84. Higgins D.G. & Sharp P.M. Fast and sensitive alignments on a microcomputer. *CABIOS*. 1989; 5: 151–153.
85. Yang Y.Y. & Li, J.K.K. Complete genomic sequences of the GP5 protein gene of bluetongue virus serotype 11 and 17. *Virus Research*. 1992; 23: 163–171.
86. Marshall J.J.A. & Roy P. High level expression of the two outer capsid proteins of bluetongue virus serotype 10: their relationship with the neutralization of virus infection. *Virus Research*. 1990; 15: 189–196.
87. Roy P., Urakawa T., van Dijk A.A. & Erasmus B.J. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *Journal of Virology*. 1990c; 64: 1998–2003.
88. Roy P., Marshall J.J.A. & French T.J. Structure of bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1990b; 162: 43–87.
89. Cromack A.S., Blue J.L. & Gratzek B. A quantitative ultrastructural study of the development of bluetongue virus in Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of General Virology*. 1971; 13: 229–244.
90. Eaton B.T., Hyatt A.D. & Brookes S.M. The replication of bluetongue virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1990; 162: 89–118.
91. Eaton B.T., Hyatt A.D. & White J.R. Localization of the nonstructural protein NS2 in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology*. 1988; 163: 527–537.
92. Urakawa T. & Roy P. Bluetongue virus tubules made in insect cells by recombinant baculoviruses: expression of NS1 gene of bluetongue virus serotype 10. *Journal of Virology*. 1988; 62: 3919–3927.
93. Huismans H. & Els H.J. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*. 1979; 92: 397–406.
94. Hewat E.A., Booth T.F., Wade R.H. & Roy P. 3-D reconstruction of bluetongue virus tubules using cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. 1992a; 108: 35–48.
95. Devaney M.A., Kendall J. & Grubman M.J. Characterization of a non-structural phosphoprotein of two orbiviruses. *Virus Research*. 1988; 1: 151–164.
96. Hyatt A.D. & Eaton B.T. Ultrastructural distribution of the major capsid proteins within bluetongue virus and infected cells. *Journal of General Virology*. 1988; 69: 805–815.
97. Thomas C.P., Booth T.F. & Roy P. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *Journal of General Virology*. 1990; 71: 2073–2083.
98. French T.J. & Roy P. Synthesis of bluetongue virus (BTV) core-like particles by a recombinant baculovirus expressing

- the two major structural core proteins of BTV. *Journal of Virology*. 1990; 64: 1530–1536.
99. Mertens P.P.C., Brown F. & Sangar D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins they encode. *Virology*. 1984; 135: 207–217.
  100. Hyatt A.D., Gould A.R. Coupar B., Eaton B.T. Localization of the non-structural protein NS3 in bluetongue virus infected cells. *Journal of General Virology* 1991; 72: 2263–2267.
  101. Au K.-S., Chan W.-K., Burns J.W. & Estes M.K. Receptor activity of rotavirus non-structural glycoprotein NS28. *Journal of Virology*. 1989; 63: 4553–4562.
  102. Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P. and Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3(2): 171–181.
  103. MacLachlan N.J., Gard G. Clinical signs and pathology. In: Mellor P., Baylis M., Mertens P.P.C. (eds.): *Bluetongue*. Academic Press. London. 2009; 285–293.
  104. MacLachlan N.J., Jagels G., Rossitto P.V., Moore P.F., Heidner H.W. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Veterinary Pathology*. 1990; 27: 223–229.
  105. Erasmus B.J. Bluetongue in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 1975; 51: 165–170.
  106. MacLachlan N.J. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1994; 17: 197–206.
  107. MacLachlan N.J., Drew C.P., Darpel K.E., Worwa G. The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*. 2009; 141: 1–16.
  108. Afshar A., Thomas F.C., Wright P.F., Shapiro J.L., Anderson J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Veterinary Record*. 1989; 124: 136–141.
  109. Afshar A. *Bluetongue: laboratory diagnosis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1994; 17: 221–242.
  110. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Chapter 2.1.9. *Bluetongue*. Office International Des Epizooties. Paris. [http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/A\\_00032.htm](http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00032.htm) (accessed June 29, 2011)
  111. Naresh A. & Prasad G. Relative superiority of c-ELISA for detection of bluetongue virus antibodies. *Indian J. Exp. Biol.* 1995; 33: 880–882.
  112. Lelli R., Portanti O., Langella V., Luciani M., Di Emidio B. & Conte A.M. Production of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of bluetongue disease. *Veterinaria Italiana*. 2003; 39: 47.
  113. Xu G., Wilson W., Mecham J., Murphy K., Zhou E.M. & Tabachnick W. VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in Culicoides variipennis. *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 1617–1623.
  114. Anderson J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immunol. Methods*. 1984; 74: 139–149.
  115. Reddington J.J., Reddington G.M. & MacLachlan N.J. A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1991; 3: 144–147.
  116. Anthony S., Jones H., Darpel K.E., Elliott H., Maan S., Samuel A., Mellor P. S. and Mertens P. P. C. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *Journal of Virological Methods*. 2006; 124: 136–141.
  117. Thomas F.C. Comparison of some storage and isolation methods to recover bluetongue virus from bovine blood. *Can. J. Comp. Med.* 1984; 48: 108–110.
  118. Goldsmith L, Barzilai E Isolation and propagation of bluetongue virus in

- embryonating chicken eggs. In: Barber TL, Jochim MM, Osburn BI (eds.): Bluetongue and Related Orbiviruses. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1985; 34: 307–318.
119. Hamblin C. Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques. Veterinaria Italiana. 2004; 40: 538–545.
  120. Boulanger P. & Frand F.J. Serological methods in the diagnosis of bluetongue. Aust. Vet. J. 1975; 51: 185–189.
  121. Lunt R.A., White J.R. & Blacksell S.D. Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. J. Gen. Virol. 1988; 69: 2729–2740.
  122. Anderson J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. J. Immunol. Methods. 1984; 74: 139–149.
  123. Kahlon J., Sugiyama K., Roy P. Molecular basis of bluetongue virus neutralization. J. Virol. 1983; 48: 627–632.
  124. Vandenbussche F., De Leeuw I., Vandemeulebroucke E., De Clercq K. Emergence of bluetongue serotypes in Europe. Part 1. Description and validation of four real-time RT-PCR assays for the serotyping of bluetongue viruses BTV-1, BTV-6, BTV-8 and BTV-11 Transbound. Emerg. Dis. 2009; 56: 346–354.
  125. Kataria R.S. et al. Sequence analysis of VP7 gene of Indian bluetongue virus serotype 23 shows its close phylogenetic relationship to Australian and Chinese serotypes. DNA Seq. 2006 Feb; 17(1): 65–73.
  126. Maan S., Maan N.S., Samuel A.R., Rao S., Attoui H. and Mertens P.P.C. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. J. Gen. Virol. 2007; 88: 621–630.
  127. Gould A.R. and Pritchard L.I. Relationships amongst bluetongue viruses revealed by comparisons of capsid and outer coat protein nucleotide sequences. Virus. Res. 1990; 17: 31–52.
  128. Gould A.R. The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates. Virus. Res. 1987; 7: 169–183.
  129. Bexiga R., Guyot H., Saegerman G. Differential diagnosis of bluetongue 8. Bluetongue in northern Europe. 2008; 57–68.
  130. Maan S., Rao S., Maan N.S., Anthony S.J., Attoui H., Samuel A.R. and P.P.C. Mertens Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. J. Virol. Methods. 2007; 143: 132–139.
  131. Bread E., Sailleau C., Nomikou K., Hamblin C., Mertens P.P.C., Mellor P.S., Harrak M.E., Zientara S. Molecular epidemiology of bluetongue virus serotype 4 isolated in the Mediterranean Basin between 1979 and 2004. Virus Res. 2007 May; 125(2): 191–197. DOI:10.1016/j.virus.2007.01.002.
  132. Howell P.G. The antigenic classification of strains of bluetongue virus, their significance and use in prophylactic immunization. D.V.Sc. thesis. Univer. of Pretoria. 1969.
  133. Howell P.G. The antigenic classification and distribution of naturally occurring strains of bluetongue virus. J.S. Afr. Vet. Med. Assoc. 1970; 41: 215–223.
  134. Erasmus B.J. Bluetongue in sheep and goats. Aust. Vet. J. 1975; 51: 165–170.
  135. Ward M.P. The epidemiology of bluetongue virus in Australia a review. Aust. Vet. J. 1994; 71(1): 3–7.
  136. Gard G.P., Shorthose J.E., Weir R.P., Erasmus B.J. The isolation of a bluetongue serotype new to Australia. Aust. Vet. J. 1987a; 64: 87.
  137. St George T.D., Standfast H.A., Cybinski D.H., Dyce A.L., Muller M.J.,

- Doherty R.L., Carley J.G., Filippich C. and C.L. Frazier. The isolation of bluetongue virus from Culicoides collected in the Northern Territory of Australia. *Aust. Vet. J.* 1978; 54: 153–161.
138. Nevill E.M., Erasmus B.J. and Venter G.J. A six-year survey of viruses associated with Culicoides biting midges throughout South Africa (Diptera: Ceratopogonidae). In: Walton T.E. and Osburn B.I. (eds), *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*. Proceedings of the 2nd International Symposium. Boca Raton. FL. CRC Press. Inc. 1992; 314–319.
139. Vogtlin A., Hofmann M.A. et al. Long-term infection of goats with bluetongue virus serotype 25. *Vet. Microbiol.* 2013 Sep 27; 166(1–2): 165–173. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.001.
140. Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B. Genetic characterization of Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus, from goats. *Switzerland Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 1855–1861.
141. Maan S., Maan N.S., Nomikou K., Veronesi E., Bachanek-Bankowska K. et al. Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS One.* 2011; 6: 26147.
142. Schulz C., Breard E., Sailleau C., Jenckel M. et al. Bluetongue virus serotype 27: detection and characterization of two novel variants in Corsica, France. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(9): 73–83.
143. Zientara S., Sailleau C., Viarouge C., Höper D., Beer M., Jenckel M., Breard E. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2123–2125.
144. Maan S., Maan N.S., Samuel A.R., O'Hara R., Meyer A.J., Rao S., Mertens P.P. Completion of the sequence analysis and comparisons of genome segment 2 (encoding outer capsid protein VP2) from representative isolates of the 24 bluetongue virus serotypes. *Vet. Ital.* 2004; 40: 484–488.
145. Bumbarov V., Golender N., Jenckel M., Wernike K., Beer M., Khinich E., Zalesky O., Erster O. Characterization of bluetongue virus serotype 28. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; 67: 171–182.
146. Wright I.M. Serological and genetic characterisation of putative new serotypes of bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus isolated from an alpaca. Thesis. North-West University. Potchefstroom. South Africa. 2014; 102.
147. Sun E.C., Huang L.P., Xu Q.Y., Wang H.X., Xue X.M., Lu P., Li W.J., Liu W., Bu Z.G., Wu D.L. Emergence of a novel bluetongue virus serotype, China 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63: 585–589.
148. Savini G., Puggolini G. et al. Novel putative Bluetongue virus in healthy goats from Sardinia, Italy. *Infection, Genetics and Evolution.* 2017; 51: 108–117.
149. Mellor P.S., Boorman J. The transmission and geographical spread of African Horse Sickness and Bluetongue viruses. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1995; 89: 1–15.
150. Xu G., Wilson W., Mecham J., Murphy K., Zhou E.M. & Tabachnick W. VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in Culicoides variipennis. *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 1617–1623.
151. Caporale V., Giovannini A. Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine: a critical review. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties.* 2010; 29: 573–591.
152. Ward M.P. The epidemiology of bluetongue virus in Australia a review. *Aust. Vet. J.* 1994; 71(1): 3–7.
153. Стрижаков А.А., Закутский Н.И., Коломыцев А.А., Книзе А.В. Эпизоотология и меры борьбы с блютангом. Ветеринария. 2008; 8: 18–22.
154. Howell P.G. The antigenic classification and distribution of naturally occurring bluetongue virus serotypes. *Vet. Parasitol.* 2004; 124: 1–10.

- corring strains of bluetongue virus. J.S. Afr. Vet. Med. Assoc. 1970; 41: 215–223.
155. Mellor P.S., Carpenter S., Harrup L., Baylis M., Mertens P.P. Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006. Prev. Vet. Med. 2008; 87: 4–20.
156. Hateley G. Bluetongue in northern Europe: the story so far. In Pract. 2009; 31: 202–209.
157. Макаров В.В., Шоопала Д., Джупина С.И., Сухарев О.И. Блютанг в начале 21 века: реальная эпизоотология. Ветеринария сегодня. 2013; 1: 8–10.
158. Макаров В.В., Сухарев О.И., Васильевич Ф.И. Блютанг 8 серотипа в Европе. Биология и эпидемиология вектора. Ветеринария. 2014; 9: 16–21.
159. Nomikou K., Batten C., Morecroft E. et al. Molecular characterization of BTV-14 in North Europe. IV International Conference on Bluetongue and related Orbiviruses. 5–7 November. Book of Abstracts. Rome. 2014; 55.
160. Захаров В.М., Гуленкин В.М., Карапулов А.К., Дудников С.А. Распространение блютанга в Европе и его реальная угроза для животноводства России. Рос. вет. журнал. СХЖ. 2007; 4: 4–6.
161. Карапулов А.К., Гуленкин В.М., Титов М.А. и др. Анализ риска заноса блютанга (катаральной лихорадки овец) со скотом, импортируемым в Россию из стран Западной Европы. Рос. вет. журн. С.-х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». 2008; 33–35.
162. Department for Environment, Food & Rural Affairs. Bluetongue Virus in Estonia, Latvia, Lithuania and Poland. 28–30 November. 2012. URL: <http://www.defra.gov.uk/animal-diseases/monitoring/poa>.
163. Savini G. et al. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the Obsoletes complex (Culecoides, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. Vet. Rec. 2005 Jul 30; 157(5): 133–139.
164. Foster N.M., Metcalf H.E., Barber T.L., Jones R.H., Luedke A.J. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus isolation from vertebrate and invertebrate hosts at a common geographic site. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1980; 176: 126–129.
165. Mellor P.S., Boorman J. and Baylis M. Culicoides biting midges: Their role as arbovirus vectors. Annu. Rev. Entomol. 2000; 45: 307–340.
166. Osburn B.I., McGowan B., Heron B., Loomis E., Bushnell R., Scott J., Utterback W. Epizootiologic study of bluetongue: virologic and serologic results. Am. Jour. of Vet. Res. 1981; 42(5): 884–887.
167. Mertens P.P.C., Burroughs J.N., Walton A., Wellby M.P., Fu H., O’Hara R.S., Brookes S.M. and Mellor P.S. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. Virology. 1996; 217: 582–593.
168. Barber T.L. Temporal appearance and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States. Am. J. Vet. Res. 1979; 40: 1654–1656.
169. Mecham J.O., Dean V.C., Wigington J.G. & Nunamaker R.A. Detection of bluetongue virus in *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) by an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. J. Med. Entomol., 1990; 27: 602–606.
170. Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J. Virol. Methods. 2007; 140: 115–123.
171. Wittmann E.J., Mello P.S., Baylis M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. Med. Vet. Entomol. 2002; 2: 147–156.
172. Howerth E.W. Studies on the pathogenesis of bluetongue virus in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Diss. Abstr. Inter. 1986; 47(4): 1497–1498.

173. Howerth E.W., Tyler D.E. Experimentally induced bluetongue virus infection in white-tailed deer: ultrastructural findings. *Amer. J. of Vet. Res.* 1988; 49(NII): 1914–1922.
174. Gard G.P., Metville L.F., Shortchase J.E. Investigations of bluetongue and other arboviruses in the blood and semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.* 1989; 20(4): 315–322.
175. Darpel K.E., Batten C.A., Venoresi E. et al. Transplacental Transmission of Bluetongue Virus 8 in Cattle, UK. *Emerg. Infect. Dis.* 2009 Dec; 15(12): 2025–2028.
176. Oberst R.D., Stott J.L., Blanchard-Channell M., Osburn B.I. Genetic reassortment of bluetongue virus serotype 11 in the bovine. *Vet. Microbiol.* 1987; 15: 11–18.
177. Ferrari G., De Liberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Zini M., Farina F., Magliano A., Cardeti G., Scholl F., Guidoni M., Scicluna M.T., Amaddeo D., Scaramozzino P. and Autorino G.L. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev. Vet. Med.* 2005; 68: 103–113.
178. Mertens P.P., Maan N.S., Prasad G., Samuel A.R., Shaw A.E., Potgieter A.C., Anthony S.J., Maan S. Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 2811–2823.
179. Batten C.A., Maan S., Shaw A.E., Maan N.S. and Mertens P.P.C. A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Res.* 2008; 137(I): 56–63.
180. Stott J.L., Oberst R.D., Channell M.B., Osburn B.I. Genome segment reassortment between two serotypes of bluetongue virus in a natural host. *J. Virol.* 1987; 61: 2670–267.
181. Savini G., MacLachlan N.J., Sanchez-Vizcaino J.M. and Zientara S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31: 101–120.
182. Veronesi E., Hamblin C. and Mellor P.S. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine*. 2005; 23: 5509–5516.
183. Parker J., Herniman K.A.J. et al. An experimental inactivated vaccine against bluetongue. *Vet. Rec.* 1975; 96(13): 284–287.
184. Savini G., Ronchi G.F., Leone A., Ciarelli A., Migliaccio P., Franchi P., Mercante M.T. and Pini A. An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Vet. Microbiol.* 2007; 124: 140–146.
185. Кошелева Р.В. Инактивированная вакцина против катаральной лихорадки овец: Методы инактивации и контроля: Дис. ... канд. вет. наук. Покров, 1984.
186. Балышева В.И. Жестерев. В.И. и др. Инактивированная эмульгированная вакцина против блютнга. Патент на изобретение (4+8+9 серотипы) RU 2 378 012 C1, 2010 г.
187. Roy P. Synthesis of particulate structures as bluetongue virus vaccine and their use as multiple immunogen delivery systems. *Bulletin de l'Institut Pasteur.* 1995; 93(1): 3–20.
188. Lobato Z.I., Coupar B.E., Gray C.P. et al. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccine virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 59: 293–309.
189. Francis J.C., Athens K., Jiansheng Y., MacLachlan N.J., Davis N.J. Recombinant vaccine against bluetongue virus. Patent EP 2 816 057 A1. 2014.
190. Спрыгин А.В., Федорова О.А., Бабин Ю.Ю., Кононов А.В., Карапулов А.К. Мокрецы рода *Culicoides* (Diptera:

- Ceratopogonidae*) и их роль в распространении блютанга и болезни Шмалленберга в России. Сельскохозяйственная биология. 2015; 50(2): 183–197.
191. Geering W.A. Control of bluetongue in an epizootic situation: Australian plans. Aust. Vet. J. 1975; 51: 220–224.
192. Вялых И.В., Фёдоров Г.П. и др. Выделение вируса блютанга от импортированного крупного рогатого скота. Ветеринария. 2010; 8: 23–26.
193. Захаров В.М. Блютанг овец и крупного рогатого скота — угроза распространения в Центрально-Азиатском регионе. Основные направления совершенствования ветеринарных услуг в эпоху могущества и счастья: Матер. Междунар. науч. конф. Ашхабад. 2013; 177–179.
194. Pritchard L.I., Sendow I., Lunt R., Hassan S.H., Kattenbelt J., Gould A.R., Daniels P.W. and Eaton B.T. Genetic diversity of bluetongue viruses in south east Asia. Virus Res. 2004; 101: 193–201.
195. Захаров В.М. Комплексность мер по предотвращению заноса и распространения блютанга в Российской Федерации. Ветеринария. 2009; 5: 3–5.
196. Hawkes R.A., Kirkland P.D., Sanders D.A., Zhang F., Li Z., Davis R.J. & Zhang N. Laboratory and field studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus. J. Virol. Methods. 2000; 85: 137–149.
197. Снетков К.А., Власова Н.Н., Цыбанов С.Ж., Стрижаков А.А., Чичикин А.Ю. Использование полимеразной цепной реакции для идентификации вирусов КЛО и ЭГБО. Генодиагностика инфекционных заболеваний: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. М., 2002; 366–368.
198. Гаврилова Е.А. Совершенствование средств мониторинга блютанга на основе полимеразной цепной реакции: дис. ... канд. вет. наук. Покров, 2010.
199. Макаров В.В., Сухарев О.И., Васильевич Ф.И. Блютанг 8 серотипа в Европе. Биология и эпидемиология вектора. Ветеринария. 2014; 9: 16–21.
200. Department for Environment Food & Rural Affairs. GB Bluetongue Virus Disease Control Strategy. 2014; [www.gov.uk/defra](http://www.gov.uk/defra).

# ЗАРАЗНЫЙ УЗЕЛКОВЫЙ ДЕРМАТИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Власова Н.Н.

**Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (ЗУД КРС),** или нодулярный дерматит (лат. *Dermatitis nodularis bovum*; англ. Lumpy skin disease of bovine; а также кожно-узелковая сыпь, узелковая экзантема, отечная болезнь кожи) — трансграничная вирусная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, образованием некротизирующихся кожных бугорков, генерализованным лимфаденитом, отеком конечностей, поражением глаз и слизистых оболочек органов дыхания, воспроизведения и пищеварения.

**Историческая справка.** Заразный узелковый дерматит как нозологическая единица впервые зарегистрирован в 1929 г. в Центральной Африке (в Замбии) и назван «ложной крапивницей» [1, 2]. В течение некоторого времени ЗУД регистрировали на нескольких африканских территориях, включая Северную Родезию (1929) [1, 2], Бечуаналенд (1943) [3], Южноафриканский Союз (1944) [4], Южную Родезию (1945) [5], Мозамбик (1946) [6], Свазиленд (1946), Басутоленд (1947) [7], Мадагаскар (1954) [8] и Бельгийское Конго (1955) [9].

Изначально симптомы ЗУД считали проявлением результатов отравления или повышенной чувствительности животных к укусам насекомых. Однако те же клинические признаки отмечались у КРС в Ботсване, Зимбабве и Южно-Африканской Республике в 1943 и 1945 гг., где при этих вспышках был предложен инфекционный характер заболевания. Впоследствии распространение ЗУД в Южной Африке приняло эпизоотический характер: было инфицировано более восьми миллионов голов крупного рогатого скота. Эпизоотия продолжала-

ться до 1949 года и принесла огромные экономические потери [10].

Впервые вирусная природа этой болезни была доказана в 1948 году Александером [11]. В 1957 году ЗУД был выявлен на востоке Африки в Кении. В Судане ЗУД был зарегистрирован в 1972 г. [12], в Западной Африке — в 1974 г., в 1983 г. болезнь распространилась в Сомали [13] и в 1990 г. достигла Египта [14]. Далее ЗУД продолжает распространяться на большей части африканского континента в серии эпизоотий, а в 2001 году о его появлении уже сообщалось на Маврикии, в Мозамбике и Сенегале.

**Распространение в мире.** До недавнего времени ЗУД считался эндемическим заболеванием для африканского континента. Тем не менее болезнь была вынесена за пределы Африки в 1984 году. Появились сообщения о вспышках на Мадагаскаре и в некоторых странах Персидского залива и Ближнего Востока. В последнее время заболевание зарегистрировано в странах, ранее свободных от ЗУД, таких, как Иордания, Сирия, Ливан, Турция, Иран и Ирак со значительными экономическими потерями для животноводства.

По данным МЭБ, в 1976–1980 гг. по ЗУД неблагополучными были 29 стран Центральной и Южной Африки. В настоящее время болезнь эндемична в Африке и на Ближнем Востоке. В 2014 году заразный узелковый дерматит регистрировался в следующих странах: Турция (230 очагов), Ливан (32), Азербайджан, Ирак, Иран, Египет.

В 2015 году к списку регионов, где диагностировалось заболевание, добавились Российская Федерация, Респу-

блика Дагестан, Северная Осетия и Чеченская Республика, Армения, Греция и Кипр. В 2016 году — Болгария, Македония, Сербия, Черногория, Казахстан и Албания [15].

В 2006 и 2007 годах ЗУД вновь появился в Египте и Израиле, в 2009 году — Фв Омане, на севере Израиля — в 2012 году, а затем быстро распространился на Ближнем Востоке: в Ливане, Палестинских автономных территориях и Иордании [16], в Турции, Кувейте, Саудовской Аравии и Ираке в 2013 году [17].

В 2014 году были зарегистрированы вспышки ЗУД в Иране и северной части Кипра, а также в Саудовской Аравии и Бахрейне [18].

Затем он распространился на северо-восток через Кавказ, захватив Азербайджан (2014), Армению и Российскую Федерацию (2015), а также Грузию и Казахстан (2016).

Впервые в Европейском союзе (ЕС) ЗУД был зарегистрирован Греции в 2015 году, не далее 15 км от ближайшего подтвержденного очага в Турции [19].

С начала эпизоотии в 2015 году ЗУД в Юго-Восточной Европе (исключая Турцию) было зарегистрировано 7900 вспышек и около 13 650 случаев [20].

В 2016 году ЗУД распространился в Болгарию, бывшую Югославскую республику: Македонию, Сербию, Черногорию, Косово и Албанию ([www.oie.int/WAHIS/Interface](http://www.oie.int/WAHIS/Interface)) [20]. В том же году о вспышках ЗУД сообщали в Иране и Ираке, а также в Азербайджане [21].

**ЗУД в Российской Федерации.** Возбудитель заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота впервые был занесен на территорию Российской Федерации в 2015 году, и в 2016 году получил широкое распространение в регионах Северо-Кавказского и Южного федеральных округов. Первый случай



Рис. 1. Распространение ЗУД в 2019 г. в странах мира

болезни в РФ зарегистрирован в 2015 г. на территории Республики Дагестан [22]. В 2016 г. на территории страны отмечено 313 вспышек инфекции в 17 субъектах [23]. Всего заболело 17853 головы КРС, пало 1559, уничтожено 30; показатель заболеваемости составил 10%, причем летальность не превышала 8,7%, а смертность — 0,9%. В 2017 г. нотифицировано 43 вспышки в 6 субъектах РФ.

Начиная с 2015 года ЗУД постоянно выявляли на территории Российской Федерации: крупные очаги распространения инфекции были зафиксированы на территории Чечни, Северной Осетии и Дагестана, а в 2017 году и на территории Республики Татарстан. Все очаги инфекции были ликвидированы на указанных территориях, а в 2017 году введена зонная защита восприимчивых животных путем вакцинации в плановом порядке, однако в том же 2017 году очаги заболевания были зарегистрированы на территориях Саратовской, Оренбургской, Волгоградской, Самарской областей, а также в Республике Башкортостан.

В связи с обострением эпизоотический ситуации по заразному узелковому дерматиту крупного рогатого скота в мире и в России был принят ряд мер по недопущению распространения этой опасной трансграничной болезни и установлен перечень регионов, в которых в обязательном порядке проводится иммунизация крупного рогатого скота против заразного узелкового дерматита.

В 2018 году на территории Самарской области был выявлен и ликвидирован 31 неблагополучный пункт, а департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации принято решение о включении Самарской области в перечень регионов, обязанных проводить вакцинацию КРС против ЗУД. Так, в рамках профилактики заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота на террито-

рии Самарской области специалистами государственной ветеринарной службы было вакцинировано 110 078 голов КРС. В 2019 году ветеринарными специалистами иммунизировано 125 037 голов восприимчивых животных в исполнение плана противоэпизоотических мероприятий по профилактике заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота.

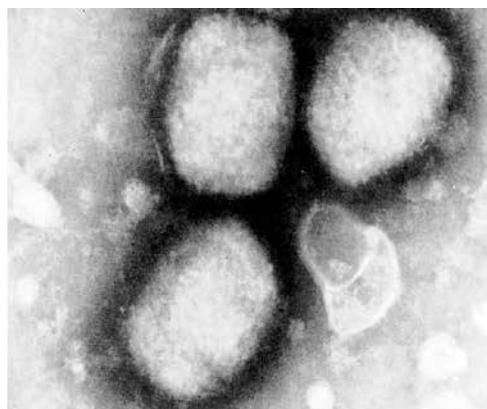
По оперативной информации информационно-аналитического отдела Россельхознадзора, в Российской Федерации по нодулярному дерматиту за 2019 год случаи заболевания заразным узелковым дерматитом КРС выявлены в Удмуртской Республике, Саратовской, Тюменской, Омской и Новосибирской областях, Алтайском крае, а по данным на начало августа 2020 года вспышек ЗУД на территории РФ не зарегистрировано.

**Социально-экономическое влияние.** ЗУД, согласно МЭБ, включен в список болезней, подлежащих незамедлительному сообщению о его возникновении, хотя и не вызывает высокую смертность заболевших животных (обычно менее 10%). Экономический ущерб, вызванный эпизоотией ЗУД, складывается из потерь в связи резким снижением молочной продуктивности, качества молока и кожевенного сырья, а также потери живой массы, абортов и мертворожденности, бесплодия, в отдельных случаях — гибели животных от условно-патогенной микрофлоры, затрат на лечение и проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. При возникновении нодулярного дерматита также может быть введен запрет на экспорт крупного рогатого скота и продуктов убоя этого вида животных.

Так, например, при вспышке в Албании в 2017 году средняя заболеваемость составила 7,2%, в то время как смертность не превышала значений 2,9%.

Вспышки ЗУД на Балканах в 2016 году привели к серьезным социально-экономическим последствиям для мелких фермеров, чьи средства к существованию в значительной степени зависели от продуктивности их молочных коров. В дополнение к этому экономические потери были вызваны дорогостоящим контролем, включающим такие меры, как полный или частичный убой инфицированных животных и вытекающая из этого необходимость выплат компенсации, затраты на дезинфекцию на пораженных фермах, вакцинацию, поддерживающее лечение и уход за больными животными, борьба с переносчиками и повышение лабораторной активности (диагностические наборы, реагенты и оборудование), а также более интенсивные расходы на мониторинг и наблюдение [24].

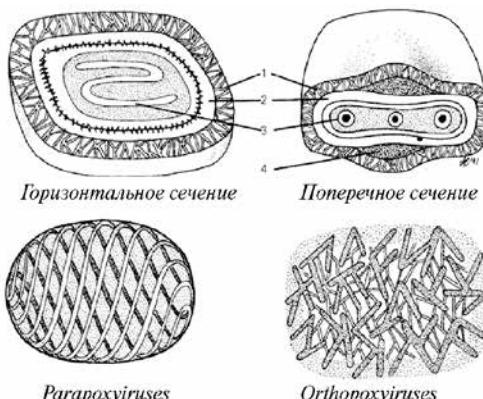
**Этиология.** Возбудителем болезни является ДНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*. Род *Capripoxvirus* включает вирусы оспы овец (ВОО) и коз (ВОК), а также вирус нодулярного дерматита или ЗУД, антигенно родственный вирусам оспы овец и коз.



а

При анализе структуры с помощью просвечивающей электронной микроскопии зрелые вирионы ЗУД (рис. 2а) имеют морфологию, сходную с таковой у ортопоксвирусов (например с вирусом осповакцины), хотя вирионы ЗУД, как правило, менее симметричны по форме, их размер в среднем составляет  $320 \times 260$  нм [25]. Изучение поперечных срезов вирионов показало наличие пары боковых тельц [рис. 2б], которые являются общим признаком для всех поксвирусов [26].

**Организация генома вируса ЗУД.** Геном вируса ЗУД представлен линейной двухцепочечной молекулой ДНК, размером 150–152 т.п. н. [27, 28], имеющей концевые замкнутые петли с незначительным количеством неспаренных нуклеотидов. Содержание оснований А+Т в нуклеотидном составе достигает 73%, и они равномерно распределены по всей длине молекулы. Как показано и для других поксвирусов, геном вируса ЗУД содержит центральную кодирующую область, ограниченную двумя идентичными зонами с инвертированными концевыми повторами (ITR), достигающими по меньшей мере 2418 п.н. на обоих концах.



б

Рис. 2. Строение вириона *Capripoxvirus* (электронно-микроскопическое изображение — а и схематическое изображение — б) [26]. 1 — двойная мембрана с нитями; 2 — поверхностный белок; 3 — ядро с матриксом и мембранным нуклеоидом; 4 — боковые тельца. Обратите внимание на различное расположение поверхностных нитей у *Orthopoxviruses* и *Parapoxviruses*.

Большинство концевых нуклеотидов в геномной последовательности содержат 7,5 копий несовершенного (неточного) tandemного повтора длиной 24 п.н. и 4 копии несовершенного tandemного повтора длиной 15 п.н. и аналогичны тем, которые описаны для вируса оспы овец [29]. Сравнение данных анализа генома вируса ЗУД с опубликованным анализом рестрикционных фрагментов ДНК показывает, что в нем могут присутствовать дополнительные концевые последовательности длиной менее 200 п.н. [30, 31].

По сравнению с другими поксвирусами геномы каприпоксвирусов относительно невелики, в среднем около 150 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), в то время как геном авипоксвируса имеет размер около 300 т.п.н. Каприпоксвирусный геном высококонсервативен у всех трех членов рода, их геномы имеют примерно 97%-ную идентичность нуклеотидной последовательности [32], однако вирус ЗУД содержит два уникальных гена, в отличие от вирусов оспы овец и коз [33].

Расположенные в центре генома гены, кодирующие структурные белки и белки, участвующие в репликации, транскрипции ДНК и т.д., наиболее консервативны, как и у других поксвирусов, за исключением менее консервативных генов «вирулентности»: кодирующих белки, участвующие в патогенезе и обладающие предполагаемой иммуномодулирующей функциональностью иммунного ответа хозяина. Они расположены в более вариабельных областях по концам молекулы ДНК [34].

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что существует только один серотип ЗУД. Вирусные изоляты, собранные в течение длительного периода из большого числа естественных случаев, вызванных вспышками заболевания на юге Африки, в Кении и Малави, обладали перекрестной нейтрализацией с прототипным

штаммом Neethling. Полное секвенирование генома недавних изолятов ЗУД Serbia/Bujanovac/2016 и Evros/GR/15 выявило их гомологию на 99,5 и 99,8% соответственно с полевым штаммом ЗУД Neethling, выделенным в Южной Африке в 2000 году, что указывает на генетическую стабильность вируса ЗУД, а также подтверждает выводы о наличии только одного серотипа у вируса ЗУД [35].

Геном вируса ЗУД содержит 156 открытых рамок считывания (ORF), которые позиционируются как предполагаемые гены. Эти гены имеют 95% кодирующую плотность и содержат информацию о вирусных белках, состоящих из 53–2025 аминокислот. Подобно другим поксвирусам, многие из 41 предполагаемого раннего гена являются членами семейства генов, определяющих рамки хозяйственной специфичности, тогда как 46 генов, содержащих позднюю промоторную последовательность TAAATG перед кодоном ATG, являются консервативными и гомологичными генам семейства поксвирусов [36].

Геном вируса ЗУД содержит консервативные поксвирусы гены, участвующие в основных репликативных механизмах: 26 генов, кодирующих субъединицы РНК-полимеразы, факторы инициации транскрипции мРНК, факторы элонгации и терминации, а также ферменты, которые направляют посттранскрипционный процессинг вирусной мРНК. Также присутствуют семь гомологов генов, участвующих в репликации ДНК.

Белки вируса, потенциально участвующие в метаболизме нуклеотидов, включают гомологи тимидинкиназы, dUTP пирофосфатазы и небольшую субъединицу рибонуклеотидредуктазы, этот состав аналогичен комплексу генов метаболизма нуклеотидов лепорипоксвирусов, и, как у лепорипоксвирусов, в нем отсутствует ген, кодирующий большую субъединицу ри-

бонуклеотидилредуктазы [37]. Наличие этого сходства отражает их филогенетическое родство и может быть значимым для тканевого тропизма.

Кроме того, геном вируса ЗУД кодирует по меньшей мере 30 гомологов поксвирусных белков, являющихся структурными или участвующими в морфогенезе и сборке вириона. К ним относятся белки, присутствующие в коре вириона; белки, присутствующие во внутриклеточном зрелом вирусе и связанных с ним мембранах; потенциальные ферменты модификации белка, упаковки ДНК и окислительно-восстановительной активности; и по крайней мере четыре белка, обусловливающие высвобождение зрелых оболочечных вирионов из клетки.

Кроме того, три белка, хотя и значительно отличающиеся от корового белка вируса оспы, на основе сходства их геномного расположения и других консервативных признаков были аннотированы как предполагаемые гомологи структурных белков вируса нодулярного дерматита.

Вирус ЗУД кодирует шесть гомологов других поксвирусных белков, влияющих на его вирулентность, рост в определенных типах клеток и клеточные апоптотические ответы. Эта группа включает гомологи эпидермального фактора роста (EGF), белков, определяющих спектр хозяев C7L вируса осповакцины и его вирулентность N1L, а также белок вирулентности A14.5L, антиапоптозные белки MYX M004 и M011L [38].

Вирус ЗУД также имеет пять белков, содержащих повторяющиеся антириноевые мотивы, два из которых (LSDV145 и LSDV147), по-видимому, являются ортологами белков, кодируемых в лепорипоксвирусах [39]. Эти гены у вируса коровьей оспы и осповакцины ингибируют вызванный ви-

русом апоптоз [40, 41, 42]. Они определяют спектр хозяев поксвируса, и эта функция, вероятно, характерна для аналогичных белков вируса ЗУД [43, 44].

Геном вируса ЗУД содержит ряд потенциальных генов с вероятными функциями в модулировании или уклонении от иммунного ответа хозяина, в модуляции или ингибировании апоптоза клеток-хозяев и в аспектах клеточного и/или тканевого тропизма. Многие из этих генов сходны по последовательности и по терминалной геномной локализации с генами, присутствующими в других поксвирусах. Тем не менее вирус ЗУД кодирует уникальные гены, которые определяют его хозяин-специфические свойства.

Шесть белков вируса участвуют в модуляции иммунного ответа хозяина, о чем свидетельствует наличие потенциальных сигнальных пептидных последовательностей и/или сходство с другими иммуномодуляторами. К ним относятся гомологи клеточного и вирусного интерлейкина-10 (IL-10), рецептор гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), IL-1R, белок, связывающий IFN- $\alpha$  / IFN- $\beta$ , и белок, связывающий IL-18. Подобно другим гомологам IL-10, присутствующим в вирусе orf и некоторых вирусах герпеса, этот белок в карбоксильном конце сильно напоминает клеточный IL-10 и, вероятно, обладает сходной иммунорегуляторной и иммуносупрессивной активностью [45, 46].

Филогенетический анализ показывает, что он отличается от клеточного IL-10 (аминокислотная идентичность 43%) и IL-10 вируса orf (аминокислотная идентичность 48%), имеющего сходство 81% с IL-10 овцы. Этот факт свидетельствует о независимом и более позднем включении IL-10 хозяина в вирус orf, чем в вирус ЗУД. В дан-

ном аспекте относительно эволюции поксивирусов вирус ЗУД является первым поксивирусом, который кодирует два дополнительных белка, связывающих IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ .

Другой белок этой группы содержит три домена иммуноглобулина (Ig), общих для IL-1R, и, вероятно, функционирует как IL-1-связывающий белок. Еще один белок не имеет третьего Ig-домена на карбоксильном конце и может выполнять аналогичную или альтернативную иммуномодулирующую функцию.

И, наконец, вирус ЗУД имеет от 97 до 100% аминокислотной идентичности по 16 генам. Терминальные области штамма 2490 вируса ЗУД были очень похожи на участки, секвенированные у двух изолятов вируса оспы овец [47]. Интересно, что между штаммом 2490 вируса ЗУД и непатогенным изолятом оспы овец из Кении KS наблюдается большая гомология нуклеотидной структуры (консервативность), чем между KS и патогенным изолятом вируса оспы овец из Индии [46]. Сравнительный анализ последовательности генома вируса ЗУД с таковыми последовательностями ВОО и ВОК помогает определить генетическую основу различий диапазона хозяев каприпоксивирусов.

**Культивирование вируса ЗУД.** Культивирование каприпоксивирусов в клеточных культурах относительно просто, хотя они размножаются в пермиссивных клетках относительно медленно и их титры достигают более низких значений ( $10^5$ – $10^6$  ТЦД<sub>50</sub>/мл), чем другие вирусы из рода *Orthopoxviruses*, такие как вирус коровьей оспы, осповакцины и т.д. Для первичного вирусовыделения ЗУД в клеточных культурах требуется срок до 11–14 дней, и может потребоваться более одного пассажа до проявления цитопатического эффекта.

Самые высокие показатели титра вируса ЗУД достижимы лишь в различных первичных клеточных культурах овечьего или бычьего происхождения, чаще всего это клетки почек или тестискул, но клетки других органов также могут быть использованы, включая надпочечники, щитовидную железу, мышцы, легкие и кожу [48, 49, 50].

Кроме того, есть несколько перевиваемых клеточных линий, которые являются пермиссивными для размножения вируса ЗУД, в том числе клетки бычьей почки Мадина-Дарби (MDBK) и тестискул овцы (ОАЗ.Ts) [51, 52].

Развитие цитопатического действия (ЦПД) может наблюдаться уже через два–три дня после инокуляции культуры, но в случае первичной изоляции вируса обычно требуется более длительный период инкубации [53, 54]. В клеточном монослое вирус вызывает появление единичных разрозненных бляшек, причем в культуре первичных клеток характерно раннее появление дискретных очагов округлых клеток с последующим образованием в монослое иррегулярных бляшек по мере гибели клеток [55]. Вирусная репликация сопровождается образованием внутрицитоплазматических телец-включенияй, сходных с теми, которые встречаются в различных клетках эпидермиса и дермы при поражениях кожи у инфицированного ЗУД скота [56].

Вирусы группы Neetling при культивировании в куриных эмбрионах размножаются в теле эмбриона и на хориоаллантоисной оболочке, образуя характерные для *Orthopoxviruses* поражения в виде оспин.

**Устойчивость вируса ЗУД.** Как и в случае других поксивирусов, вирус ЗУД обладает высокой стабильностью при высушивании и замораживании. В шкурах больных животных, хранящихся в темных условиях, ви-

рус может сохранять свою активность многие месяцы. Жизнеспособный инфекционный вирус выделяется из некротических узлов кожи до 33 дней, но этот период может быть намного дольше [57].

Вирус ЗУД сохраняет свою инфекционную активность в вируссодержащей культуральной жидкости, хранившейся при температуре 4°C в течение шести месяцев [53].

Однако вирус нодулярного дерматита чувствителен к эфиру (20%), хлороформу, формалину (1%) и некоторым детергентам (додецилсульфат натрия), а также к фенолу (2% фенол инактивирует в течение 15 минут).

Для помещений рекомендована обработка 2–3% раствором гипохлорита натрия, раствором соединений йода (1:33), препаратом Virkon в концентрации 2% или другими дезинфектантами на основе четвертичных соединений аммония.

Возбудитель ЗУД инактивируется при температуре 55°C в течение 2 часов, а при 65°C — в течение 30 минут.

Однако вирус ЗУД слабочувствителен к изменениям кислотно-щелочного баланса среды: в интервале значений рН между 6,6 и 8,6 препараты вируса не показали значительного снижения титра при температуре 37°C в течение пяти дней (Руководство МЭБ [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/LUMPY\\_SKIN\\_DISEASE\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/LUMPY_SKIN_DISEASE_FINAL.pdf)).

**Клинические признаки ЗУД.** Существуют огромные различия в уровнях заболеваемости и смертности при вспышках ЗУД, что зависит от следующих факторов: географического положения и климата; условий управления; статуса питания и общего состояния животного; породы крупного рогатого скота; иммунного статуса;

величины популяции и распространения предполагаемых насекомых-переносчиков в различных средах обитания; вирулентности циркулирующего вируса. Уровень заболеваемости ЗУД колеблется от 5 до 45%. Однако наиболее регистрируемым считается уровень заболеваемости от 1 до 5%. Более высокие показатели наблюдали при эпизоотиях в Южной, Западной и Восточной Африке и Судане. Кроме того, в 2009 году в Омане у поголовья крупного рогатого скота на ферме также были зарегистрированы высокие показатели заболеваемости и смертности — 30–45 и 12% соответственно.

У коров наблюдаютсяabortы, mastиты, нарушения воспроизводительной функции, у быков — временная импотенция или полное бесплодие [58].

Молодые телята более восприимчивы к заболеванию, и у них может развиться характерное поражение в течение 24–48 часов, хотя им подвержены все возрастные группы животных. Однако у телят нодулярный дерматит может протекать и без видимых повреждений кожи. При этом заболевание характеризуется лихорадкой, диареей с примесью крови и слизи [14]. При выздоровлении бугорки и воспаления, как правило, исчезают, на их месте шерсть выпадает, шкура отделяется лоскутами, а затем нарастает новая.

В естественных условиях инкубационный период при нодулярном дерматите составляет 2–4 недели.

При **остром** течении болезнь характеризуется повышением температуры тела до 40°C (4–14 дней), снижением аппетита, слезотечением, выделениями из носа и ротовой полости (слизистые или гнойные), появлением узелковой сыпи через 48 ч. (рис. 3а и 3б).



Рис. 3. Клинические признаки ЗУД у КРС.

Фото взяты из интернет-источника: <https://www.facebook.com/groups/166744947071730/>

Узелки незначительно приподняты над кожей, округлые, хорошо отграничены, имеют размеры от 0,2 до 7 см (рис. 3б). Число узелков может быть от нескольких штук до многих сотен в зависимости от тяжести болезни. Они могут располагаться по всему телу, но особенно на бедрах, конечностях, промежности, вокруг глаз, на морде, вымени (рис. 4а). При тяжелом течении болезни бугорки могут появляться на слизистой оболочке полости рта и носа, на вульве и крайней плоти (рис. 4б). Лимфоузлы, как правило, увеличены, особенно предлопаточные и паховые [59].

Через 1–3 недели с момента появления бугорков ткань внутри них полностью некротизируется, образуются секвестры, бугорки вскрываются, из них выделяется тягучая слизистая жидкость с неприятным запахом. После выздоровления бугорки и признаки воспаления (в течение 4–6 недель) исчезают. На их месте выпадает шерсть, кожа отделяется лоскутами (рис. 4в). Узелки иногда отвердевают и сохраняются почти год. Впоследствии они рассасываются, но чаще некротизируются (рис. 4г), подсыхают, формируя сухие струпья, под которыми появляется грануляционная ткань. Рубцевание этих по-

ражений часто затруднено и длительно из-за развития осложнений, вызванных различной банальной микрофлорой.

Больные животные быстро худеют, снижается продуктивность. У лактирующих коров при поражении вымени молоко становится более густым, приобретает розовый оттенок, сдаивается каплями, при нагревании превращается в гель. Заболевание может осложняться также поражением органов дыхания и пищеварения, репродуктивных органов и суставов с развитием соответствующих симптомов болезни. При этом имеют место затрудненный брюшной тип дыхания, обильная саливация, серозный или серозно-гнойный конъюнктивит, помутнение роговицы, увеличение региональных лимфатических узлов.

При тяжелой форме течения болезни поражаются органы пищеварения и дыхания. В них образуются плоские круглые, серовато-желтые некротические узелки, которые в дальнейшем нагнаиваются и изъязвляются. Из ротовой полости выделяется густая тягучая слюна, а из носа — гнойная слизь со зловонным запахом. При тяжелой форме отмечается длительная лихорадка, потеря аппетита, исхудание. Бугорки образуются по всему туловищу, на на-



Рис. 4. Поражение кожи и слизистых оболочек при ЗУД.

Фото взяты из Coetzer J.A.W., Tuppurainen E., Babiuk S., Wallace D.B. Lumpy skin disease (review), 2018

ружных слизистых оболочках, а также в трахее, глотке, возможно также развитие бронхопневмонии или отека легких и асфиксии со смертельным исходом.

При *подостром* течении заметных признаков кожных поражений не наблюдают. Болезнь проявляется кратковременной лихорадкой (2–5 дней), отсутствием аппетита. Как правило, через одну-две недели после заражения у крупного рогатого скота развивается фебрильная реакция (рис. 5а) [60, 61, 62]. Иногда лихорадка у животных продолжается от 4 до 14 дней, в течение которых отмечают чрезмерное слюноотделение, слезотечение и слизистые выделения из носа. Носовые выделения позже становятся слизисто-гнойными.

Слезотечение может осложняться последующим конъюнктивитом, а в некоторых случаях эрозиями на оболочке конъюнктивы, что в конечном итоге приводит к непрозрачности роговицы и слепоте (рис. 5б).

*Хроническое течение* ЗУД также наблюдается у 1–7% инфицированных животных: отмечаются фиброзные и затвердевающие поражения кожи. Возможно развитие таких осложнений, как трахеит, воспаление легких, заболевание половых органов, пищеварительного тракта, поражение суставов. В случаях осложнения вторичной инфекцией в глубоких слоях кожи и подкожной клетчатки появляется отек, вокруг которого развивается воспаление. Иногда наблюдаются отеки



Рис. 5. Клинические проявления подострой формы ЗУД.

Фото взяты из Coetzer J.A.W., Tuppurainen E., Babiuk S., Wallace D.B. Lumpy skin disease (review), 2018

в области головы, груди, подгрудка, вымени, наружных половых органов и конечностей.

**Атипичная и инаппаратная формы** обычно лечения не требуют. Иногда бессимптомное переболевание выявляется лишь по наличию вирус-нейтрализующих антител в сыворотке крови. В пораженных стадах, как правило, регистрируют до 50% животных, переболевающих бессимптомно.

**Патологоанатомические изменения.** Как правило, вирус в крови появляется через 3–4 дня после подъема температуры и массового появления бугорков, сопровождающегося гиперплазией эпителия кожи. Бугорки на разрезе сероватого цвета, плотной кон-

систенции. Некротизированные бугорки содержат казеозные массы, под которыми образуются язвочки.

У инфицированных животных появляются также бугорки на поверхности мышц, между мышечными волокнами, в слизистой оболочке носовых ходов, глотки, в трахее, легких, почках, в стенах сычуга, рубца. Кожа и подкожная клетчатка инфильтрованы красноватой жидкостью.

В этот период вирус проникает в слизистые оболочки рта, носа, влагалища, препутия, а также в слюнные и молочные железы, семенники. Воспалительный процесс охватывает лимфатические узлы и лимфатические сосуды, этиологическим аспектом которого мо-



Рис. 6. Патогенез ЗУД при подостром течении болезни: а — серо-желтые очаги некроза глотки и гортани; б — некротические участки в трахее

жет являться и секундарная инфекция. Лимфоузлы увеличены, отечны.

На плевре, в селезенке, сердце, печени, слизистых слизу, носовых раковин и кишечника, чаще тонких кишок, имеются кровоизлияния. На слизистой оболочке в области дна желудка и пищевода, а также в легких иногда обнаруживаются язвы. У отдельных павших животных регистрируют отек и повреждение суставов.

У павших от ЗУД животных обнаруживаются серьезные поражения органов дыхания, такие как изъязвление и отек легких (*рис. 7а*), а также некротические изменения и стеноз трахеи (*рис. 7б*).

При гистологическом исследовании выявляются признаки некроза эпидермиса и сосочкового слоя дермы. По краям некротизированных участков заметны утолщения эпидермиса и гиперкератоз, отек дермы и ее инфильтрация фибробластами, гистиоцитами и лимфоцитами. Под некротизированной тканью можно обнаружить тромбы в венах и периваскулярную клеточную инфильтрацию в лимфатических узлах — увеличенное количество плазматических клеток, лимфоцитов и эозинофилов, а при некрозе — нейтрофилов [62].

Микроскопически поражения значительно различаются в зависимости от

стадии развития. В начальной стадии болезни эпителиальные клетки увеличены, и в них появляются вакуоли. В гистосрезах бугорков в эпителиальных клетках и гистиоцитах обнаруживают цитоплазматические включения круглой или овальной формы крупного размера, сравнимого с размером клеточного ядра [63].

В острой стадии заболевания васкулит иногда сопровождается тромбозом и инфарктом, а также периваскулярной фиброплазией и инфильтрацией макрофагами, лимфоцитами и эозинофилами, в частности в дерму и подкожную клетчатку. В кератиноцитах эпидермиса обнаруживают баллонную дегенерацию и могут наблюдаться признаки лизиса, внутри- и межклеточного отека с образованием пузырьков, а также некоторую степень акантоза, паракератоза и гиперкератоза.

В острой и подострой стадиях заболевания могут присутствовать эозинофильные внутрицитоплазматические включения (*рис. 8*) размером от 1 мкм до размера ядра, особенно в макрофагах и кератиноцитах кожи, кроме того, могут наблюдаться перициты, ацинарные и протоковые эпителиальные клетки слизи и серозных желез. Ультраструктурно вироплазмы (включения) выглядят как хорошо очерченные участки от мелкозернистых до фибриллярных отложений

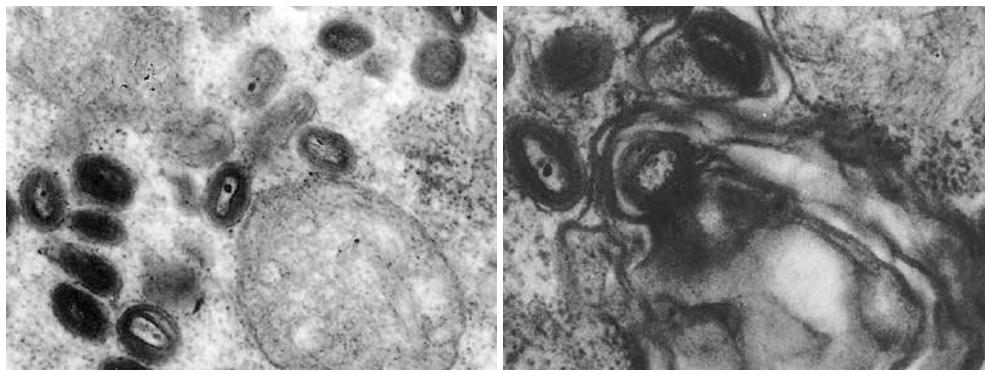


а



б

Рис. 7. Патологические изменения при тяжелом течении болезни: а — отек легких; б — стеноз трахеи



а

б

**Рис. 8. Многочисленные вирусные частицы в цитоплазме макрофага (а и б)**

(Coetzer J.A.W., Tuppurainen E., Babuik S., Wallace D.B. Lumpy skin disease (review), 2018)

ний, которые содержат развивающиеся вирионы, зрелые вирусные частицы и иногда скопление трубчатых структур.

**Диагностика ЗУД.** Диагностирование ЗУД основывается на анализе таких эпизоотологических данных, как заболеваемость, смертность, внезапное проявление болезни одновременно на нескольких фермах, быстрое нарастание числа заболевших животных (порой охват достигает 70% животных), период массового вылета переносчиков и т.п.

При первичном обследовании стада предполагаемый диагноз на ЗУД может основываться на выявлении следующих клинических признаков: постоянная лихорадка, истощение, наличие кожных бугорков, захватывающих все слои кожи и подлежащие ткани, а также некротические поражения, локализованные на слизистых оболочках естественных отверстий; чрезмерное слюноотделение, слезотечение и слизистые выделения из носа, а также увеличение поверхностных лимфоузлов и появление отеков. Как правило, проводят выявление характерных патологоанатомических изменений:

- поражение слизистой оболочки рта, глотки, надгортанника, языка и всего пищеварительного тракта, слизистых оболочек полости носа, трахеи и

легких; отек и области очагового лобулярного ателектаза в легких;

- в тяжелых случаях — плеврит с расширением средостенных лимфатических узлов;

- синовит и тендосиновит с фибрином в синовиальной жидкости;

- в яичках и мочевом пузыре могут присутствовать оспенные поражения.

Для установления окончательного диагноза проводят лабораторные исследования.

По рекомендации МЭБ, подтверждающий диагноз на ЗУД может основываться на результатах лабораторных исследований по идентификации агента [64] различными методами. К основным лабораторным исследованиям на ЗУД относят выделение и идентификацию вируса, определение наличия антигена или вирусного генома, а также выявление вируснейтрализующих антител. Для выявления антигенов вируса могут использоваться метод прямого иммунофлуоресцентного мечения и ИФА. Среди наиболее подходящих серологических методов — непрямой метод флуоресцирующих антител, реакция нейтрализации и вестерн-блоттинг.

При ЗУД иммунный статус ранее зараженных или вакцинированных животных непосредственно не связан с

уровнем нейтрализующих антител в сыворотке. Серонегативные животные в какой-то момент могли быть инфицированы, но уровень антител у них не всегда увеличивается.

Уровень нейтрализующих антител начинает расти примерно через неделю после выявления клинических признаков, и антитела достигают самого высокого уровня у пораженных животных примерно на две–три недели позже. Затем уровень антител начинает снижаться, в конечном итоге падает ниже порога обнаружения. В случае продолжающихся вспышек у большинства инфицированных животных происходит сероконверсия, и тогда образцы сыворотки можно анализировать с помощью реакции вирус нейтрализации, иммунопероксидазного монослойного анализа (ИПМА) [65] или непрямого метода флуоресцирующих антител (нМФА) [66].

В межэпизоотический период (то есть в годы между эпизоотиями) серологическое наблюдение является сложной задачей, потому что долгосрочный иммунитет против вируса ЗУД преимущественно клеточно-опосредованный и в настоящее время доступные серологические тесты недостаточно чувствительны, чтобы обнаружить слабую или давнюю инфекцию ЗУД.

**Выделение вируса.** Выделение и типирование вируса проводят с использованием культуры клеток и дальнейшей постановкой реакции нейтрализации. Образцы для выделения вируса должны быть собраны в течение первой недели после проявления клинических признаков, до начала появления нейтрализующих антител в сыворотке крови животных [67, 68].

Образцы для исследования получают при биопсии кожи ранних повреждений, не имеющих областей некроза, и используют для выделения вируса и в электронной микроскопии.

Кроме того, вирус ЗУД может быть выделен и из образца крови, собранного в ЭДТА или гепарин во время виремической стадии болезни. Образцы из увеличенных лимфатических узлов также могут быть использованы для выделения вируса. Клетки дермы или клетки тестикул телят считаются наиболее восприимчивыми клетками. Вирус ЗУД размножается также в 5–7-дневных куриных эмбрионах, в перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero), однако эти линии не рекомендуются для первичной изоляции возбудителя [64].

Размножение вируса вызывает цитопатогенное изменение клеток с образованием цитоплазматических телец-включений. Специфичность вируса подтверждают биопробой на восприимчивых животных — телятах, козах, овцах, кроликах, морских свинках и новорожденных мышатах или в teste с флуоресцентными антителами.

У зараженных коз на 5–8-й день после нанесения вируса на скарифицированную кожу появляется утолщение и струпья, которые отпадают через 7–11 дней. У овец реакция выражается в развитии некротических процессов. У кроликов через 4–6 дней развивается выраженная местная воспалительная реакция с дальнейшим образованием струпа. У морской свинки появляется отек кожи, а центральная часть пораженного участка чернеет и некротизируется.

**Тест с флуоресцентными антителами и реакция прямой иммунофлюоресценции (РПИФ).** Антиген вируса ЗУД может быть идентифицирован с использованием препаратов на покровных или предметных стеклах или фиксированной культуры клеток с использованием коньюгата моноклональных или поликлональных антител, коньюгированных с флуоресцентным красителем, таким как флуоресцинозиотионат (ФИТЦ).

**РПИФ** основана на обнаружении антигенов в мазках-отпечатках, в срезах тканей с помощью меченых **ФИТЦ** антител. Метод позволяет детально анализировать биологические образцы на присутствие антигенных детерминант, характерных для ЗУД, проводить количественную оценку как поверхностных, так и внутриклеточных белков.

Это очень быстрый, простой и чувствительный тест, который может быть использован также при исследовании зараженных культур клеток. Использование люминесцентного микроскопа позволяет четко выявить интенсивную флюoresценцию цитоплазматических включений в инфицированных клетках.

Однако важно отметить, что при подострой и хронической форме ЗУД РПИФ имеет значительно меньшую чувствительность, которая обусловлена образованием у инфицированных животных комплексов антиген–антитело, блокирующих взаимодействие целевого антигена со специфическими антителами коньюгата.

**Электронная микроскопия (ЭМ).** Диагностика ЗУД с помощью просвечивающей электронной микроскопии может дать подтверждение диагноза в течение нескольких часов после получения образцов. Характерные вирусные частицы можно наблюдать методом трансмиссивной электронной микроскопии образцов, полученных при биопсии, или образцов засохших корочек. Зрелые вирионы каприпоксвирусов имеют средний размер 320–260 нм, более овальный профиль и крупные боковые тельца, чем вирионы других ортопоксвирусов [64]. В сочетании с присутствием характерных очагов поражения на коже и увеличением лимфатических узлов результат анализа с помощью ЭМ является основанием для постановки диагноза.

**При гистологическом исследовании** в срезах тканей бугорков обнаруживают

эозинофильные цитоплазматические включения, расположенные в клетках эпителиального слоя.

Образец, взятый при биопсии кожи ранних поражений, максимально подходит для исследования в гистопатологии, но он должен храниться в 10% забуференном формалине. К наиболее характерным диагностическим особенностям при гистопатологическом анализе относятся застой крови, кровотечение, отек, васкулит и некроз, которые всегда связаны с узелками, проникающими во все слои кожи, подкожную клетчатку и часто прилегающую мускулатуру; лимфоидная пролиферация; отек, застой и кровотечение, васкулит, тромбоз, инфаркт, периваскулярная фиброплазия и клеточные инфильтраты.

**Иммунодиффузия в агарозном геле.** Тест радиальной иммунодиффузии в агарозном геле (РИД) использовался ранее для обнаружения преципитирующего антигена каприпоксвирусов, но его недостаток заключается в том, что выявляемый в этом тесте антиген является общим как для каприпоксвирусов, так и для парапоксвирусов.

**Иммуноферментный анализ.** В настоящее время применение ИФА для выявления антител к каприпоксвирусам не рекомендовано МЭБ. Исходя из высокой степени гомологии геномов и кодируемых ими белков каприпоксвирусов, очевидно наличие перекрестных реакций, поэтому сертифицированных на данный момент ИФА-наборов с надлежащей чувствительностью не существует.

Наиболее часто ИФА-анализ для выявления антигена проводят по стандартной методике с использованием моноспецифической поликлональной сыворотки или моноклональных антител (MAb), полученных к рекомбинантному антигену P32 вируса ЗУД [69]. С развитием рекомбинантных техноло-

гий весьма вероятно, что ELISA-тест для ЗУД скоро станет коммерчески доступным.

**ПЦР-диагностика.** В настоящее время для диагностики нодулярного дерматита КРС используют молекулярно-генетические методы диагностики.

Как указывалось ранее, представители рода *Capripoxvirus* (ВОО, ВОК и вирус ЗУД КРС) являются генетически близкими и имеют нуклеотидную гомологию более 96%. Это генетическое сходство сделало возможным и необходимым применение быстрых, чувствительных и групповых анализов методом ПЦР в реальном времени, которые получили признание во все возрастающем количестве национальных справочных лабораторий. Создано несколько коммерческих диагностических наборов на основе ПЦР для обнаружения каприпоксвирусов, например количественный ПЦР Techne [qPCR], Genesi Standard and Advanced Kit, Tetracore, Biosellal.

Усовершенствование технологии ПЦР позволило также разработать несколько тестов, которые могут дифференцировать геномы ВОО, ВОК и вируса ЗУД [70], и одноэтапный мультиплексный анализ RT-*qPCR*, предназначенный для одновременного обнаружения *peste des petits* вирусов жвачных животных, каприпоксвирусов, *Pasteurella multocida* и *Mycoplasma capricolum*.

На современном этапе также стали доступны тест-системы с использованием полимеразной цепной реакции для дифференциации вируса ЗУД дикого типа и его аттенуированных вакцинных штаммов, что крайне необходимо при обнаружении клинических признаков у животных после вакцинации [71, 72, 73, 74, 75]. Иногда во время вспышки ЗУД у вакцинированного крупного рогатого скота могут

быть обнаружены характерные клинические признаки после иммунизации вакцинами, содержащими ВОО и ВОК или гомологичный аттенуированный вирус. В таких случаях целесообразно использовать методы ПЦР, предназначенные для генотипирования вирусов с учетом специфики вида, чтобы определить, является ли вакциненный вирус или вирус ЗУД дикого типа причиной заболевания в этих случаях [76, 77, 78]. Эти же ПЦР-тесты подходят и для подтверждения присутствия ВОО или ВОК у некоторых видов диких антилоп, восприимчивых к этим вирусам.

Для диагностических целей доступны также четыре метода с применением петлевой изотермической амплификации (LAMP) [79, 80]. Преимущество тест-систем на основе LAMP заключается в том, что их можно использовать с меньшими затратами по сравнению с анализом ПЦР в реальном времени, так как они не требуют дорогостоящего оборудования.

**Секвенирование.** Поскольку с развитием метода цена на секвенирование постоянно снижается, определение нуклеотидных последовательностей полноразмерных вирусных геномов сейчас относительно дешево, этот быстрый и доступный метод предоставляет большой объем информации об изучаемом изоляте вируса.

Секвенирование и сравнительный анализ генома вирулентных и вакцинных изолятов вируса ЗУД выявили цепь ряд различий между ними [81, 82]. Природные изоляты оказались более консервативными, чем ожидалось, по сравнению с вакцинными штаммами, прошедшиими длительное пассирование в культуре клеток.

Полногеномное секвенирование позволяет четко определить возможные пути распространения возбудителя заразного узелкового дерматита и уста-

новить возможность возникновения нового высокопатогенного реассортанта, как, например, обнаруженный в Саратовской области изолят RUSSIA/Saratov/2017, в регионе, граничащем с Казахстаном. Выполненное Спрыгином с соавт. полногеномное секвенирование вирусного генома с использованием платформы Illumina позволило установить, что геном этого изолята содержит основу аттенуированного вакцинного штамма с локусными вставками фрагментов ДНК полевого вируса дикого типа [83]. Авторами было идентифицировано до 27 событий рекомбинации. Среднее расстояние между сайтами рекомбинации составило 3400 пар оснований (п.н.).

Таким образом, при наличии соответствующих данных эпизоотологического и клинического обследования диагноз на заразный узелковый дерматит считается установленным, если в пробах от больных или подозреваемых в заболевании животных обнаружен либо вирус заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота, либо его геном или его антиген.

Дифференциальный диагноз. Заразный узелковый дерматит необходимо дифференцировать от *крапивницы*, *стрептомицоза*, *демодекоза*, *оспы*, кожной формы туберкулеза, а также от последствий укусов клещей и жалящих насекомых. ЗУД следует также отличать от псевдоузелковой болезни кожи (*pseudo-lumpy skin disease*), вызванной вирусом Allerton, который относится к семейству герпесвирусов 2 типа. Вызванное герпесвирусом поражение кожи характеризуется тем, что бугорки локализуются на ее поверхности и после некротизации ткани образовавшийся струп отпадает, а кожа становится голой, неповрежденной.

*Дерматофилэ́з* вызывает хроническое поражение кожи, характеризу-

ющееся образованием папул в поверхностных слоях кожи, которые выступают на ее поверхности в виде полупрозрачных узелков; при кожной форме *туберкулёза* бугорки локализуются вдоль мест прохождения лимфатических сосудов конечностей и шеи, бугорки подкожные и сохраняются более длительный период времени. Кожная реакция на укусы насекомых проявляется с хорошо заметными болезненными поражениями, не ограниченными воспалительной бороздкой и т.д. При генерализации инфекционного процесса, сопровождающегося поражением слизистых, ЗУД следует дифференцировать от ящура, блютанга, инфекционного ринотрахеита, пагриппа.

## Эпизоотология и меры борьбы с ЗУД

**Эпизоотологические данные.** Нодулярный дерматит регистрируется в форме отдельных вспышек и эпизодий, характеризуется сезонностью (отмечается в жаркий, влажный сезон), приурочен к низинным, заболоченным местам, где обитает большое количество членистоногих различных видов. Болезнь появляется внезапно и одновременно в удаленных друг от друга местах, распространяется быстро. Заболеваемость составляет от 5 до 45%, что зависит от породных особенностей и резистентности организма [84].

Вирус ЗУД имеет узкий круг позвоночных-хозяев. Крупный рогатый скот и буйволы — это виды, которые заражаются естественным путем во время полевых вспышек. Сообщалось о пяти случаях клинических случаев ЗУД у азиатского водяного буйвола *Bubalus bubalis* [14].



Рис. 9. ЗУД у буйвола [85]

Другие виды домашних жвачных во время полевых вспышек естественным путем не заражаются. Все породы крупного рогатого скота одинаково восприимчивы к болезни. Однако некоторые исследователи обнаружили, что импортные породы с тонкой кожей, такие как зебу (*Bos taurus*), крупный рогатый скот Фрисландии и породы с Нормандских островов, были гораздо более восприимчивыми, чем местные породы с более толстой кожей, такие как гибриды африканеров.

Был описан единственный клинический случай инфекции, вызванной, вероятно, вирусом нодулярного дерматита, у аравийского орикса (*Oryx leucoryx* — антилопа из рода сернобыков) в зоопарке Саудовской Аравии [86].

Экспериментальное заражение некоторых диких видов, таких как антилопа импала (*Aepyceros melampus*), газель Томсона (*Gazella thomsonii*) и жираф (*Giraffa camelopardalis*), сопровождалась развитием поражений кожи, характерных для ЗУД [87].

Овцы и козы не заражаются во время вспышек ЗУД, даже если они находятся в тесном контакте с инфицированным скотом. В полевых условиях у африканских буйволов (*Syncerus caffer*) не наблюдают поражений во время эпизоотии ЗУД, как и большинства азиатских буйволов *Bubalus bubalis*. Оба типа буйволов

не проявляют явных клинических признаков инфекции, но у них регистрируется легко детектируемая сероконверсия.

В Египте было зарегистрировано пять случаев ЗУД-подобных поражений у буйволов. Контактное инфицирование может происходить регулярно, но это случается лишь с небольшой частотой и не является основным механизмом передачи вируса во время эпизоотий. Перемещение животных из зараженных стад, часто через несколько месяцев после выздоровления, регулярно приводит к занесению инфекции. Считается, что источником вируса являются застарелые поражения кожи. В большинстве стран Африки к югу от Сахары болезнь проявляется после сезонных дождей, когда увеличивается популяция разных видов членистоногих. Локальное перемещение болезни в условиях строгого карантина связывают с воздушным передвижением насекомых-переносчиков в слабых воздушных потоках. С наступлением морозов в Южной Африке и Египте количество случаев заражения ЗУД резко сокращается.

Сведений о восприимчивости человека к вирусу заразного узелкового дерматита нет.

**Переносчики и передача инфекции.** Пути передачи вируса мало изучены. Основными считаются контактный и трансмиссионный — посредством насекомых, являющихся, по-видимому, лишь механическими переносчиками.

Наиболее частым механизмом передачи вируса на короткие расстояния считается распространение вируса через укусы насекомых. В качестве потенциальных векторов в настоящее время рассматриваются такие виды членистоногих, как мухи-жигалки *Stomoxys calcitrans*, комары *Aedes aegypti*, клещи *Amblyomma hebraeum* и *Rhipicephalus appendiculatus*. Вирусная ДНК также обнаруживается на поверхности экзоскелета домашних мух *Musca*

*domestica*. В доступной литературе описаны результаты многих исследований по изучению роли членистоногих в распространении вируса заразного узелкового дерматита, однако представленные данные противоречивы и не отвечают однозначно на вопрос о степени значимости изучаемых потенциальных векторов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота при развитии эпизоотического процесса в полевых условиях [88].

Считается, что в большинстве случаев заражение происходит в результате механической передачи вируса членистоногими. Такое распространение вируса ЗУД в основном связано с летающими насекомыми, и все возможные факты подтверждают полевые наблюдения, что эпизоотии ЗУД происходят в периоды наибольшей активности летающих кусающих насекомых. Уровни атак в разных эпизоотиях варьируют от 10–15 до

100% из-за различий в активности видов переносчиков, встречающихся в определенных ситуациях. Вызывает сомнение роль осенних жигалок (*Stomoxys calcitrans*), слепней (*Tabanidae*) и мухи цеце (*Glossina*) в засушливых условиях, и, вероятно, эти виды связаны с более низкими уровнями передачи (рис. 10а, б, в). В то же время огромные резервуары размножения комаров после дождя являются обычным явлением и их значительная роль в передаче инфекции может быть вполне реальна из-за очень высоких показателей заболеваемости.

Достоверно установлено, что клещи также являются переносчиками вируса: они играют роль как механических переносчиков, так и резервуаров вируса ЗУД, поскольку он может сохраняться в этих паразитах и в периоды между эпизоотиями, поскольку вирус ЗУД был обнаружен в слюне и органах у перезимовавших клещей. Обнаружены три вида кровососу-



а



б



в



г

Рис. 10. Осенние жигалки (а), слепни (в), мухи цеце (б) и коричневый ушной клещ (г)

щих твердых клещей, которые участвуют в передаче вируса ЗУД в Африке к югу от Сахары. К этим видам клещей, определенным как переносчики болезни, относятся *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (синий клещ), *R. appendiculatus* (коричневый ушной клещ) и *Amblyomma hebraeum* (костяной клещ) [89]. Указанные виды клещей могут распространяться на большие расстояния, перемещаясь вместе со своим животным-хозяином, например питаясь на перелетных птицах. На современном этапе изменение климата из-за глобального потепления позволяет клещам успешно выживать и в районах, где раньше они не могли выжить из-за очень холодных условий.

Прерванное кормление — естественная модель поведения самца коричневого ушного клеша и африканского костяного клеша. Экспериментально было показано, что самцы *R. appendiculatus* передают вирус ЗУД механически от инфицированного животного к интактному [90]. Есть несколько доказательств того, что самцы *A. hebraeum* ведут себя аналогичным образом, и вероятность, что они также могут участвовать в передаче вируса, довольно высока [91].

Инфицированные самки африканского синего клеша, *R. (Boophilus) decoloratus*, передают вирус ЗУД через яйца личинкам, которые, в свою очередь, могут заразить неинфицированный скот [92].

Аналогичные доказательства роли твердых клещей в передаче ЗУД представлены в работах Tuppurainen et al. Их молекулярно-генетические исследования доказали наличие трансстадиальной и трансовариальной передачи вируса ЗУД клещами *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, а также механической или интрастадиальной передачи клещами *Rhipicephalus appendiculatus* и *Amblyomma hebraeum* [93].

В ряде экспериментов было получено подтверждение передачи через *S. calcitrans* вириуса ЗУД, выделенного из *Stomoxys calcitrans* и *Musca confiscale*. Однако, несмотря на обнаружение вируса у комаров (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*) и мошек (*Culicoides nebulosus*) после того, как они пытались на инфицированных «прокормителях» (КРС) с пораженной кожей, не удалось подтвердить передачу инфекции восприимчивым животным [94].

Спектр возможных членистоногих — переносчиков ЗУД в пораженных регионах варьирует в зависимости от сезона, температуры и влажности окружающей среды, а также типа растительности, способствующей размножению и выживанию разных видов насекомых. В большинстве стран Африки к югу от Сахары, где ЗУД является эндемическим, высокая плотность и распространенность многих видов клещей более важна в аспекте возможных переносчиков, чем в странах Ближнего Востока, Европы и Балкан, где количество клещей гораздо меньше.

В Албании, например, большинство молочного скота содержится в помещении в небольшом замкнутом пространстве, животные используют одни и те же кормушки и поилки. В этом случае клещи играют второстепенную роль в передаче болезни, в то время как слюна и выделения из носа, загрязненный корм и питьевая вода являются более важным фактором передачи возбудителя [95].

В Греции было показано, что риск заражения ЗУД был в шесть раз выше там, где крупный рогатый скот сдерживался на открытом воздухе, чем в помещении, потому что на открытом воздухе более высока подверженность заражения через членистоногих-переносчиков [96].

**Факторами передачи** возбудителя инфекции являются продукты убоя, молоко, сперма животных, в том числе находящихся в инкубационном периоде; корма, вода, навоз, транспорт и другие

объекты внешней среды, контаминированные вирусом ЗУД. Возможна передача вируса при непосредственном контакте больных и здоровых, половым путем, у телят — через молоко.

**Источником возбудителя инфекции** являются больные и латентно переболевшие животные. Вирус выделяется в окружающую среду и в инкубационный период, и в период болезни животного с истечениями из пораженных участков кожи, носовой полости и глаз, а также со слюной, спермой, молоком и с выдыхаемым воздухом.

Крупный рогатый скот может заразиться ЗУД через питьевую воду, хотя алиментарный путь заражения и прямая контактная передача не являются основными распространенными способами, даже если вирус присутствует в носовых и слезных выделениях, сперме и молоке инфицированных животных. Передача вируса ЗУД через сперму (естественное спаривание или искусственное осеменение) экспериментально не продемонстрирована, но живой возбудитель был выделен из спермы экспериментально инфицированных быков.

Существует возможность и внутриматочного инфицирования, что подтверждается наличием обширных кожных поражений у abortированных плодов и телят [97].

## Контроль и меры борьбы с распространением ЗУД

Контроль распространения ЗУД путем карантина и ограничения перемещений недостаточно эффективен, поскольку мухи, мошки, комары и некоторые виды клещей, скорее всего, являются наиболее важным вектором передачи болезни. Борьба с насекомыми для предотвращения распространения ЗУД дает определенные результаты, поскольку

использование инсектицидов вместе с репеллентами помогает предотвратить распространение этой инфекции.

**«Стемпинг-аут».** Наиболее эффективно вспышки болезни можно ликвидировать с помощью депопуляции инфицированных и подвергшихся воздействию вируса животных, надлежащей утилизации туш, очистки и дезинфекции помещений, а также борьбы с насекомыми.

В Греции и наиболее пострадавших балканских странах тотальный «стемпинг-аут» проводился перед иммунизацией одобренной к применению живой аттенуированной вакциной. Греция и Болгария элиминировали всех инфицированных и контактировавших с больными животных на протяжении всей эпизоотии. Но необходимо учитьвать негативное влияние тотального санитарного убоя на средства к существованию, продовольственную безопасность и благосостояние людей: эти последствия не следует недооценивать, особенно в том, что касается наиболее уязвимых производителей, немногочисленные животные которых часто являются их основным источником дохода.

В соответствии с решением Совета Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) по ЗУД, вакцинация оказывает наибольшее влияние на сокращение ареала распространения болезни, чем санитарный убой, и при правильно проведенной вакцинации дополнительные преимущества санитарного убоя становятся малозначимы [98].

Мероприятия по предотвращению циркуляции вируса нодулярного дерматита включают охранные меры по недопущению появления в хозяйствах животных — источников возбудителя. Также проводится периодическая обработка животных и помещений, в которых они содержатся, репеллентами и инсектицидами.

В некоторых пораженных странах был рекомендован модифицированный или частичный убой больных животных в стадах, поскольку они являлись более серьезным источником вируса для гематофагов, чем субклинически инфицированные животные, и полное выздоровление их было маловероятным. Для того чтобы фермеры могли сотрудничать с властями, выплачивалась компенсация за тот скот, который умер или был выбракован по ЗУД. Выбраковка животных производилась гуманным и безопасным способом с быстрой и надлежащей утилизацией туш, которые перед утилизацией опрыскивали дезинфицирующим средством и репеллентом от насекомых, чтобы насекомые не питались ими.

Поскольку нет достоверных данных, что вирус ЗУД, как и другие поксвирусы, может выживать в окружающей среде в течение длительного периода времени, то восстановление поголовья должно производиться после минимального периода ожидания в 21 день, как указано в действующем законодательстве ЕС (Директива Совета 92/119/EEC), а повторно приобретаемые животные должны быть вакцинированы не менее чем за 28 дней до помещения в места, которые были ранее заражены.

При подозрении на ЗУД, основанном на данных эпизоотологического обследования стада, и выявлении у животных характерных для нодулярного дерматита клинических признаков и патологоанатомических изменений вводится ряд ограничений, заключающихся в обязанности владельцев животных информировать ветеринарных специалистов о подозрении; в изоляции больных, подозреваемых и контактировавших животных; в прекращении всех передвижений и перегруппировки КРС; в исключении возможности контакта персонала, обслуживающего больных и подозреваемых животных,

с другими животными; в исключении выноса вируса с транспортом за пределы предприятия.

В РФ меры по ликвидации ЗУД предпринимаются в соответствии с «Ветеринарными правилами осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота» (зарегистрировано в Минюсте России 07.06.2017 № 46974).

Согласно этим правилам, к основным мерам ликвидации ЗУД в очаге относятся: запреты на перемещение животных, посещение хозяйства посторонними, выезд автотранспорта без дезинфекции, а также необходимость убоя больных животных и уничтожение продуктов убоя. В стаде проводят изъятие больных и непосредственно контактировавших животных, трупы павших и убитых животных, остатки кормов и подстилку уничтожают в пределах неблагополучного пункта; молоко, полученное от животных в очаге, перерабатывают на месте или обеззараживают пастеризацией при 85°C в течение 30 минут или кипячением в течение не менее 5 мин.

В очаге проводят трехкратную дезинфекцию зарегистрированными для этих целей в РФ химическими веществами, оставшиеся в очаге корма сжигают или утилизируют другими методами; навоз обрабатывают дезинфицирующими средствами и проводят бургование на территории хозяйства, мойку и дезинфекцию транспортных средств, спецодежду и резиновую обувь персонала обеззараживают парами формальдегида в пароформалиновой камере.

В качестве мероприятий в угрожаемой зоне (3 км) ежедневно проводят клинический осмотр КРС и обработку репеллен-

тами для отпугивания насекомых, всех восприимчивых животных подвергают иммунизации гетерологичной вакциной из вирусов оспы овец и коз в соответствии с инструкциями по их применению.

В зоне наблюдения (10 км) проводится ежедневный клинический осмотр стад КРС, дезинсекция и обработка животных репеллентами.

С неблагополучного по нодулярному дерматиту КРС хозяйства карантин снимается через 30 дней после выздоровления последнего животного в эпизоотическом очаге и проведения других мероприятий по уничтожению вируса ЗУД. После снятия карантина запрещается вывозить КРС за пределы бывшего неблагополучного пункта, кроме поставок для убоя на мясокомбинат; на территории бывшего неблагополучного пункта в течение года за 1 месяц до начала лета членистоногих — переносчиков вируса заразного узелкового дерматита КРС проводят поголовную вакцинацию животных гетерологичной вирус-вакциной против оспы овец или оспы овец и коз.

Главное внимание должно быть направлено на недопущение заноса возбудителя болезни из других стран. С этой целью необходимо осуществление жесткого мониторинга за ввозом в страну животных, продуктов их убоя, спермы, молока и молочных продуктов, прежде всего из стран, неблагополучных по данной болезни.

При ввозе животных из других стран обязательным является профилактическое карантинирование с проведением соответствующих диагностических исследований, также необходимо проведение поголовной идентификации крупного рогатого скота, биркование всего имеющегося на подведомственной территории поголовья животных и ужесточение контроля за обеспечением владельцами животных и хозяйствующими субъектами биологической без-

опасности скотоводческих хозяйств, особенно молочно-товарных ферм.

## Лечение и профилактика ЗУД

**Лечение.** Специфические методы лечения ЗУД не разработаны. Применяется в основном симптоматическое лечение, направленное на снижение тяжести протекания болезни и предохранение от развития осложнений, которые обусловлены секундарной инфекцией. Животным создаются хорошие условия кормления, содержания, обрабатывают их кожный покров лекарственными и дезинфицирующими средствами, для инъекций применяют антибиотики, сульфаниламидные препараты. Однако в некоторых случаях для лечения вторичных бактериальных инфекций, борьбы с лихорадкой или воспалением и для улучшения аппетита животного используются противовоспалительные препараты и инъекции витаминов. При применении такой комплексной терапии выздоравливает до 90% заболевших животных.

**Специфическая профилактика.** Переболевшие животные приобретают невосприимчивость к повторному заражению вирусом ЗУД. Тем не менее, по отдельным сведениям, иммунитет у переболевших животных сохраняется только до 11 месяцев. Средств пассивной профилактики нодулярного дерматита нет. Как показала практика, полноценный контроль распространения ЗУД возможен только с помощью сочетания вакцинации, иммунопрофилактики и стратегии «стемпинг-аута».

Для активной специфической профилактики используют как гомологичные живые аттенуированные вирусные вакцины из штамма Neethling, так и гетерологичные живые аттенуированные вирусные вакцины из штаммов каприпоксвирусов оспы овец и коз [99].

Все штаммы каприпоксвирусов, которые используются в качестве вакцины, могут вызывать сильную местную реакцию в месте инъекции. Рекомендемая прививная доза из гомологичного вируса — 2,5 Ig<sub>50</sub>/мл, а доза гетерологичной вакцины на основе вируса оспы овец и коз — 3,5 Ig<sub>50</sub>/мл (10-кратная «овечья» доза). При плановой вакцинации первую иммунизацию проводят трехмесячному молодняку. Ревакцинацию проводят через 12 месяцев. В неблагополучном пункте и в хозяйствах угрожаемой зоны вакцинируют всех здоровых животных независимо от срока предыдущей иммунизации. Молодняк в возрасте до 6 месяцев прививают двукратно с интервалом в 14 суток.

Живые вакцины помогают минимизировать потери от нодулярного дерматита в эндемичных районах [100]. По данным МЭБ, 4 живых аттенуированных штамма каприпоксвирусов были использованы в качестве вакцин специально для борьбы с ЗУД:

- кенийский штамм вируса оспы овец и коз, прошедший 18 пассажей в клетках семенников ягненка (LT) или клетках мышц плода теленка;
- югославский штамм оспы овец RM 65;
- румынский штамм оспы овец;
- штамм вируса нодулярного дерматита из Южной Африки, 60 пассажей в клетках почек ягненка и 20 последующих пассажей на хориоаллантической мемbrane куриных эмбрионов [101, 102, 103, 104].

В России и ряде других стран для профилактики заразного узлового дерматита используют вакцины на основе гетерологичных каприпоксвирусов — ослабленных вирусов оспы овец и коз [105].

Использование гомологичной вакцины против ЗУД КРС в РФ запрещено Россельхознадзором в 2018 г., поскольку

ослабленный вирус нодулярного дерматита, применяемый ЕС в гомологичных вакцинах, при определенных условиях внешней среды может мутировать и вызывать поствакцинальные осложнения: повышение температуры тела, временное снижение надоев и живой массы, появление бугорков на теле. На риски применения гомологичных вакцин указывают также публикации специалистов из Сербии и Греции, где подобная вакцинация животных провоцировала образование нодулей и снижение надоев [106, 107].

Также зарубежные ученые отмечали, что применение гомологичных вакцин может вызывать поствакцинальные осложнения с клиническим проявлением ЗУД, такими как повышение температуры тела, временное снижение надоев и живой массы, выделение вируса во внешнюю среду с истечениями [108]. В описанных условиях вакциненный штамм вируса ЗУД может бесконтрольно распространяться среди восприимчивого поголовья. При коинфицировании одного животного-хозяина возможны рекомбинации между гомологичными вирусами с непредсказуемыми эпизоотологическими последствиями. Установлено, что использование живых вакцин против вируса ЗУД КРС на основе



Рис. 11. Поверхностные генерализованные поражения кожи после вакцинации гомологичной вакциной [106]

штамма Neethling несет значительные риски, связанные с восстановлением вирулентных свойств вакцинного штамма и его рекомбинацией с полевыми изолятами возбудителя [105].

В результате мониторинговых исследований, проводимых в ФГБУ «ВНИИЗЖ», было выявлено, что в 2015–2016 годах на территории РФ обнаруживали только полевые изоляты вируса ЗУД, генетически идентичные изоляту, выделенному в 2015 году в Дагестане [109]. С 2017 года в ряде регионов Приволжского федерального округа, в частности в Саратовской и Самарской областях, а также в Башкирии начали отмечать случаи выявления от клинически больных животных вакциноподобного изолята вируса ЗУД типа Neethling [110].

Результаты анализа фрагмента гена GPCR (600 п.н.) показали, что выявленные изоляты имеют стопроцентный уровень гомологии с вакцинным штаммом LSDV Vaccine Neethling LW 1959 [111]. Все случаи выявления данных изолятов регистрировались в приграничных регионах России на расстоянии от 3 до 100 км от границы с Казахстаном. Следует отметить, что именно с 2017 года и по настоящее время в Казахстане, в граничащих с Россией районах Западно-Казахстанской, Актюбинской и Кустанайской областей, специфическую профилактику против ЗУД КРС проводят с использованием гомологичной вакцины Lumpivax TM (Кения), безопасность которой была проверена только на лабораторных белых мышах и кроликах.

В 2018 году вакциноподобный изолят типа Neethling был выявлен уже в девяноста процентах случаев вспышек на территории российских регионов, граничащих с Казахстаном. При этом филогенетический анализ выделенных вакциноподобных изолятов показал, что они представляют собой рекомбinantные вирусы, содержащие в своем геноме фрагменты

вакцинного штамма и полевых изолятов вируса ЗУД. Доказано, что клинические проявления заболевания у животных, зараженных вакциноподобными изолятами типа Neethling, не отличаются от симптомов, вызываемых полевыми изолятами и вирулентными штаммами вируса ЗУД. Ученые ФГБУ «ВНИИЗЖ» предоставили доказательства генетического обмена между близкородственными вариантами каприпоксвирусов в полевых условиях — полевым изолятом и вакцинным штаммом, что обуславливает необходимость пересмотреть вопрос о целесообразности вакцинации с использованием живых аттенуированных штаммов для обеспечения безопасной и эффективной стратегии профилактики и контроля распространения ЗУД в мире [109, 111].

Очевидно, что выявленные рекомбinantные вирусы представляют такую же угрозу для животных, как и исходные вирулентные полевые изоляты ЗУД, а использование живых аттенуированных вирусов в качестве защитных препаратов во время активной вспышки создает потенциальную угрозу для коинфекции хозяев и появления штамма, объединяющего генетические фрагменты как родительской вакцины, так и полевого вируса [112], что и было обнаружено у изолята из Саратовской области в 2018 г. [111].

В России для защиты от ЗУД применяется вирусвакцина против оспы овец и заразного узелкового дерматита «Шип-Покс-ЛСД вак». Ее введение вызывает формирование у привитых животных защиты от заразного узелкового дерматита через 5 суток после однократного применения, с продолжительностью не менее 12 месяцев, но лечебными свойствами она не обладает. Вакцина безвредна при применении, не контагиозна, что позволяет избежать бесконтрольной циркуляции вакцинного вируса в стаде.

## Литература

1. Morris J.P.A. Ann. Rep. for 1930, Dept. Animal Health, N. Rhodesia, 1931; 12.
2. MacDonald R.A.S. Ann. Rep. for 1930, Dept. Animal Health, N. Rhodesia, 1931; 20.
3. Von Backstrom, U. J. South Afr. Vet. Med. Assoc. 1945; 16: 29.
4. Thomas A.D., and Mare C.V.E. J. South Afr. Vet. Med. Assoc. 1945; 16: 36.
5. Huston P.D. Rep. Chief Vet. Surgeon, S. Rhodesia. 1945.
6. De Sousa D.A., and Limpopo-Serra J. Off. Int. des Epiz., 1956; 46: 612.
7. Diesel A.M. Rep. Fourteenth Int. Vet. Congress. 1949; 492.
8. Lalanne L. Off. Int. des Epiz. 1956; 46: 596.
9. Ann. Rept. Vet. Services, Katanga Prov., Belgian Congo, Anon. 1955; 74.
10. Diesel A.M. The epizootiology of lumpy skin disease in South Africa. Proc. 14th Int. Vet. Cong. London. 1949; 2: 492–500.
11. Alexander R.A., Plowright W. & Haig D.A. Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease of cattle. Bulletin of Epizootic Diseases of Africa. 1957; 5: 489–492.
12. Ali B.H. and Obeid H.H. Investigation of the first outbreak of LSD in Sudan. Bri. Vet. J. 1977; 133: 184–189.
13. Davies F.G. Lumpy skin disease of cattle: A growing problem in Africa and the Near East. World Animal Review. 1991; 68: 37–42.
14. Ali A.A., Esmat M., Attia H., Selim A. & Abdel Hamid Y.M. Clinical and pathological studies on lumpy skin disease in Egypt. Vet. Rec. 1990; 127: 549–550.
15. Семакина В.П., Жильцова М.В., Саввин А.В., Акимова Т.П. Распространение заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) крупного рогатого скота в мире. Ветеринария сегодня. 2017; 3(22): 13–19.
16. Abutarbush S.M., Ababneh M.M., AL Zoubi I.G., Al Sheyab O.M., Al Zoubi M.G., Alekish M.O. & Al Gharabat R.J. Lumpy skin disease in Jordan: disease emergence, clinical signs, complications and preliminary-associated economic losses. Transboundary and Emerging Diseases. 2015; 62: 549–554.
17. AL-Salihi K.A. & Hassan I.Q. Lumpy skin disease in Iraq: Study of the disease emergence. Transboundary and Emerging Diseases. epub March 17. 2015. DOI: 10.1111/tbed.12386.
18. Tasioudi K.E., Antoniou S.E., Iliadou P., Sachpatzidis A., Plevraki E., Aganiotaki E.I., Fouki C., Mangana-Vougiouka O., Chondrokouki E. & Dile C. Emergence of Lumpy Skin Disease in Greece. Transboundary and Emerging Diseases. 2015; 63(3): 260–265.
19. Bedekovic T., Simic I., Kresic N., & Lojkic I. Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination. Transboundary and Emerging Diseases. 2017. <https://doi.org/10.1111/tbed.12730>.
20. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report on lumpy skin disease II. Data collection and analysis. European Food Safety Authority Journal, 2018; 16(2): 5176. 33. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5176>.
21. Zeynalova S., Asadov K., Guliyev F., Vatani M. & Aliyev V. Epizootiology and Molecular Diagnosis of Lumpy Skin Disease among Livestock in Azerbaijan. Frontiers in Microbiology. 2016; 7: 1022.
22. Кононов А.В., Кононова С.В., Шумилова И.Н. и др. Культурально-биологические свойства возбудителя нодулярного дерматита крупного рогатого скота, выделенного на территории Российской Федерации в 2015 году. Ветеринария сегодня. 2016; 3: 8–18.

23. World Organization for Animal Health/OIE. — URL: <http://www.oie.int/>.
24. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report on lumpy skin disease II. Data collection and analysis. European Food Safety Authority Journal. 2018; 16(2): 5176. 33. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5176>.
25. Weiss K.E. Lumpy skin disease virus. Virology Monographs. 1968; 3: 111–131.
26. Munz E.K. & Owen N.C. Electron microscopic studies on lumpy skin disease virus type ‘Neethling’. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1966; 33: 3–8.
27. Fick W.C. and Viljoen G.J. Early and late transcriptional phases in the replication of lumpy-skin-disease virus. Onderstepoort J. Vet. Res. 1994; 61: 255–261.
28. Gershon P.D. and Black D.N. A comparison of the genomes of capripoxvirus isolates of sheep, goats and cattle. Virology 1988; 164: 341–349.
29. Gershon P.D. and Black D.N. A capripoxvirus pseudogene whose only intact homologs are in other poxvirus genomes. Virology. 1989; 172: 350–354.
30. Gershon P.D. and Black D.N. Physical characterization of the genome of a cattle isolate of capripoxvirus. Virology. 1987; 160: 473–476.
31. Kitching R.P., Bhat P.P. and Black D.N. The characterization of African strains of capripoxvirus. Epidemiol. Infect. 1989; 102: 335–343.
32. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F. & Rock D.L. Genome of Lumpy Skin Disease Virus. Journal of Virology. 2001; 75: 7122–7130.
33. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur J.H., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L., The genomes of sheepox and goatpox viruses. Journal of Virology. 2002; 76: 6054–6061.
34. Kara P.D., Afonso C.L., Wallace D.B., Kutish G.F., Abolnik C., Lu Z., Vreede F.T., Taljaard L.C., Zsak A., Viljoen G.J. & Rock D.L. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of lumpy skin disease virus. Archives of Virology. 2003; 148: 1335–1356.
35. Toplak I., Petrovic T., Vidanovic D., Lazic S., Sekler M., Manic M., Petrovic M. & Kuhar U. Complete genome sequence of Lumpy Skin Disease virus isolate SER-BIA/Bujanovac/2016, detected during an outbreak in the Balkan Area. Genome Announcements. 2017; 5: 35.
36. Moss B. Poxviridae: the viruses and their replication. In Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M. (ed.). Fields virology. Lippincott-Raven. Philadelphia. Pa. 1996; 2637–2671.
37. Willer D.O., McFadden G., and Evans D.H. The complete genome sequence of shope (rabbit) fibroma virus. Virology. 1999; 264: 319–343.
38. Cameron C., Hota-Mitchell S., Chen L., Barrett J., Cao J.X., Macaulay C., Willer D., Evans D. and G. McFadden. The complete DNA sequence of myxoma virus. Virology. 1999; 264: 298–318.
39. Willer D.O., McFadden G. and Evans D.H. The complete genome sequence of shope (rabbit) fibroma virus. Virology. 1999; 264: 319–343.
40. Gillard S., Spehner D., Drillien R., and Kirn A. Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 83: 5573–5577.
41. Mossman K., Lee S.F., Barry M., Boshkov L., and McFadden G. Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. J. Virol. 1996; 70: 4394–4410.
42. Spehner D., Gillard S., Drillien R., and Kirn A. A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells. J. Virol. 1988; 62: 1297–1304.
43. Antoine G., Scheiflinger F., Dorner F., and Falkner F.G. The complete genome

- ic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. 1998; 244: 365–396.
44. Shchelkunov, S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V. and Kotwal G.J. The genome sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology*. 1998; 243: 432–460.
  45. Fleming S.B., Haig D.M., Nettleton P., Reid H.W., McCaughan C.A., Wise L.M. and Mercer A. Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes*. 2000; 21: 85–95.
  46. Moore K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., and Mosmann T.R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 165–190.
  47. Gershon P.D. and Black D.N. A capripoxvirus pseudogene whose only intact homologs are in other poxvirus genomes. *Virology*. 1989; 172: 350–354.
  48. Anon 1996. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 4th Edition. Office International des Epizooties. World Health Organization.
  49. Plowright W. & Witcomb M.A. The growth in tissue cultures of a virus derived from lumpy skin disease of cattle. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1959; 78: 397–407.
  50. Prydie J. & Coackley W. Lumpy skin disease: Tissue culture studies. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*. 1959; 7: 37–49.
  51. Babiuk S., Parkyn G., Copps J., Clarence J.E., Sabara M.I., Bowden T.R., Boyle D.B. & Kitching R.P. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2007; 19: 486–491.
  52. Binepal Y.S., Ongadi F.A. & Chepkwony J.C. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2001; 68: 151–153.
  53. Weiss K.E. Lumpy skin disease virus. *Virology Monographs*. 1968; 3, 111–131.
  54. Weiss K.E. & Geyer S.M. The effect of lactalbumin hydrolysate on the cytopathogenesis of lumpy skin disease virus in tissue culture. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*. 1959; 7: 243.
  55. Munz E.K. & Owen N.C. Electron microscopic studies on lumpy skin disease virus type 'Neethling'. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1966; 33: 3–8.
  56. De Lange M. The histopathology of the cytopathogenic changes produced in monolayer epithelial cultures by viruses associated with lumpy skin disease. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1959; 28: 245.
  57. Tuppurainen E., Coetzer J.A.W. & Venter E. Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, South Africa., Weiss K.E. & Geyer S.M., 1959. The effect of lactalbumin hydrolysate on the cytopathogenesis of lumpy skin disease virus in tissue culture. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*. 2003; 7: 243.
  58. Nawathe D.R., Gibbs E.P.J., Asagba M.O. & Lawman M.J.P. Lumpy skin disease in Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*. 1978; 10: 49–54.
  59. Woods J.A. Lumpy skin disease — a review. *Tropical Animal Health and Production*. 1988; 20: 11–17.
  60. Babiuk S., Bowden T.R., Parkyn G., Dalman B., Manning L., Neufeld J., Embury-Hyatt C., Copps J. & Boyle D.B. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transboundary and Emerging Disease*. 2008; 55: 299–307.
  61. Carn V.M. & Kitching R.P. The clinical response of cattle experimentally

- infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. Archives of Virology. 1995; 140: 503–513.
62. Haig D.A. Lumpy skin disease. Bulletin of Epizootic Diseases of Africa. 1957; 5: 421–430.
  63. Prozesky L. & Barnard B.J.H. A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1982; 49: 167–175.
  64. OIE Terrestrial Manual. Lumpy Skin Disease. 2010; Chapter 2.4.14 (Available at [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2)).
  65. Haegeman A., De Leeuw E., Mostin L., Van Campe W., Aerts L., Vastag M., De Clercq K. An Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. Journal of Virological Methods. 2020; 277. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113800>.
  66. Gari G., Biteau-Coroller F., Le Goff C., Caufour P. & Roger F. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. Vet. Microbiol. 2008; 129(3–4): 269–280.
  67. Davies F.G., Krauss H., Lund L.J., Taylor M. The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. Res. Vet. Sci. 1971; 12: 123–127.
  68. Davies F.G. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. Br. Vet. J. 1991; 147:489–502.
  69. Carn V.M., Kitching R.P., Hammond J.M., Chand P., Anderson J., Black D.N. Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus. Journal of Virological Methods. 1994; 49(3): 285–294.
  70. Спрыгин А.В., Пестова Я.Е., Кострова Е.С., Кононова С.В., Быдовская О.П., Жбанова Т.В., Кононов А.В. Тест-системы ПЦР для выявления генома каприпоксвирусов и вируса заразного узелкового дерматита. Сельскохозяйственная биология. 2019; 54(2): 347–358. doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.347rus.
  71. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report on lumpy skin disease II. Data collection and analysis. European Food Safety Authority Journal. 2018; 16(2): 5176, 33. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5176>.
  72. Katsoulos P.D., Chaintoutis S.C., Dovas C.I., Polizopoulou Z.S., Brellou G.D., Agianniotaki E.I., Tasioudi K.E., Chondrokouki E., Papadopoulos O., Karatzias H. & Boscos C. Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease. Transboundary and Emerging Diseases. 2017. doi:10.1111/tbed.12646.
  73. Menasherow S., Erster O., Rubinstein-Giuni M., Kovtunenko A., Eyngor E., Gelman B., Khinich E., & Stram Y. A high-resolution melting (HRM) assay for the differentiation between Israeli field and Neethling vaccine lumpy skin disease viruses. Journal of Virological Methods. 2016; 232: 12–15.
  74. Menasherow S., Rubinstein-Giuni M., Kovtunenko A., Eyngor Y., Fridgut O., Rotenberg D., Khinich Y. & Stram Y. Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of lumpy skin disease virus (LSDV). Journal of Virological Methods. 2014; 199: 95–101.
  75. Vidanovic D., Sekler M., Petrovic T., Debeljak Z., Vaskovic N., Matovic K. & Hoffmann B. Real-time PCR assays for the specific detection of field Balkan strains of lumpy skin disease virus. Acta Veterinaria Beograd. 2016; 66: 444–454.
  76. Haegeman A., Zro K., Sammin D., Vandebussche F., Ennaji M.M., De Clercq K. Investigation of a Possible Link Between Vaccination and the 2010 Sheep Pox Epizootic in Morocco. Transboundary and emerging disease 2016. 2015; 64(6): 278–287.
  77. Gelaye E., Lamien C.E., Silber R., Tuppurainen E.S., Grabherr R. & Diallo A.

- Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. PLoS One. 2013; 8: e75971.
78. Gelaye E., Mach L., Kolodziejek J., Grabherr R., Loitsch A., Achenbach J.E., Nowotny N., Diallo A. & Lamien C.E. A novel HRM assay for the simultaneous detection and differentiation of eight poxviruses of medical and veterinary importance. Scientific Reports. 2017; 7: 42892.
79. Das A., Babiuk S. & McIntosh M.T. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50: 1613–1620.
80. Murray L., Edwards L., Tuppurainen E.S.M., Bachanek-Bankowska K., Oura C.A.L., Mioulet V. & King D.P. Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. BMC Veterinary Research. 2013; 9: 117–127.
81. Gelaye E., Belay A., Ayelet G., Jenberie S., Yami M., Loitsch A., Tuppurainen E., Grabherr R., Diallo A. & Lamien C. Capripox disease in Ethiopia: Genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. Antiviral Research. 2015; 119: 28–35.
82. Kara P.D., Afonso C.L., Wallace D.B., Kutish G.F., Abolnik C., Lu Z., Vreede F.T., Taljaard L.C., Zsak A., Viljoen G.J. & Rock D.L. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of lumpy skin disease virus. Archives of Virology. 2003; 148: 1335–1356.
83. Sprygin A., Babin Yu., Pestova Y., Kononova S., Wallace D.B., van Schalwyk A., Byadovskaya O., Diev V., Lozovoy D., Kononov A. Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. PloS One. 2018; 13(12).
84. Wainwright S., El Idrissi A., Mattioli R., Tibbo M., Njeumi F., Raizman E. Emergence of lumpy skin disease in the Eastern Mediterranean Basin countries. empres watch. 2013; 29. © FAO 2013. <http://www.fao.org/ag/empres.html>
85. Abdi Feyisa. A Case Report on Clinical Management of Lumpy Skin Disease in Bull. Journal of Veterinary Science and Technology. 2018; 09(03). DOI: 10.4172/2157-7579.1000538.
86. Greth A., Gourreau J.M., Vassart M., Vy N.B., Wyers M., Lefevre P.C. Capripoxvirus disease in an Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia. Journal of Wildlife Diseases. 1992; 28(2): 295–300. 15 ref.
87. Young E., Basson P.A., Weiss K. Experimental infection of the giraffe, impala and the Cape buffalo with lumpy skin disease virus. Onderstepoort J. Vet. Res. 1968; 37: 79–86.
88. Пестова Я.Е., Кононов А.В., Спрыгин А.В. Энтомологические аспекты эпизоотологии заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота (обзор). Ветеринария сегодня. 2019; 1(28): 16–21.
89. Lubinga J. PhD thesis: The role of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum* ticks in the transmission of lumpy skin disease virus (LSDV). 2014.
90. Tuppurainen E.S.M., Lubinga J.C., Stoltzsz W.H., Troskie M., Carpenter S.T., Coetzer J.A.W., Venter E.H. & Oura C.A.L. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. Epidemiology and Infection. 2013a; 141: 425–430.
91. Tuppurainen E.S.M., Lubinga J.C., Stoltzsz W.H., Troskie M., Wallace D.B., Oura C.A.L., Mellor P.S., Coetzer J.A.W., & Venter E.H. A potential role for ixodid (hard) tick vectors in the transmission of lumpy skin disease virus in cattle. Transboundary and Emerging Diseases. 2011; 58(2): 93–104.
92. Tuppurainen E.S.M., Lubinga J.C., Stoltzsz W.H., Troskie M., Carpenter S.T.,

- Coetzer J.A.W., Venter E.H. & Oura C.A.L. Evidence of vertical transmission of lumpy skin disease virus in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2013b; 4: 329–333.
93. Tuppurainen E.S.M. and Oura C.A.L. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transbound. emerg. Dis.* 2012; 59: 40–48.
94. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P. & Mellor P.S. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiology & Infection*. 2001; 126(2): 317–321.
95. Gubbins S., Stegeman A., Klement E., Pite L., Broglia A., Abrahantes J.C. Inferences about the transmission of lumpy skin disease virus between herds from outbreaks in Albania in 2016. *Preventive Veterinary Medicine*. Available online. 17 December 2018; 104602.
96. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report on lumpy skin disease II. Data collection and analysis. *European Food Safety Authority Journal*. 2018; 16(2): 5176, 33. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5176>.
97. Irons P.C., Tuppurainen E.S.M., Venter E.H. Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*. 2005; 63(5): 1290–1297.
98. European Food Safety Authority (EFSA). Strengthening regional cooperation in South East Europe and Middle East for prevention and control of Lumpy Skin Disease (LSD). 13, EFSA supporting publication, 1059. 2019.
99. Gari G., Abie G., Gizaw D., Wubete A., Kidane M., Asgedom H., Bayissa B., Ayelet G., Oura C.A., Roger F. & Tuppurainen E.S. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine*. 2015; 33: 3256–3261.
100. Lumpy skin disease — vaccination. FAO Animal Production and Health Online Seminar. Food & Agriculture Organisation of the UN. Rome. 2015. [http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/LSD\\_webinar\\_april2015.html](http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/LSD_webinar_april2015.html)
101. Brenner J., Haimovitz M., Oron E., Stram Y., Fridgut O., Bumbarov V., Kuznetzova L., Oved Z., Waserman A., Garazzi S., Perl S., Lahav D., Edery N. and Yadin H. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel. *Isr. J. vet. Med.* 2006; 61: 73–77.
102. Capstick P.B., Coackley W. Protection of cattle against lumpy skin disease. I Trials with a vaccine against Neethling type infection. *Res. Vet. Sci.* 1961; 2: 362–368.
103. Capstick P.B., Coakley W. Lumpy Skin disease. The determination of the immune status of cattle by an intra-dermal test. *Res. Vet. Sci.* 1962; 3: 287–291.
104. Carn V.M., Kitching R.P., Hammond J.M., Chand P., Anderson J., Black D.N. Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus. *Journal of Virological Methods*. 1994; 49(3): 285–294. Источник: <https://www.vetandlife.ru/vizh/mneniya/u-kogo-cheshutsya-ruki/>
105. Katsoulos P.D., Chaintoutis S.C., Dovas C.I., Polizopoulou Z.S., Brellou G.D., Agianniotaki E.I., Tasioudi K.E., Chondrokouki E., Papadopoulos O., Karatzias H., Boscos C. Investigation on the incidence of adverse reactions, viraemia and haematological changes following field immunization of cattle using a live attenuated vaccine against lumpy skin disease. *Transbound Emerg Dis.* February 2018; 65(1): 174–185. <https://doi.org/10.1111/tbed.12646>.
106. Bedekovic T, Simic I, Kresic N, Lojkic I.(2018) Detection of lumpy skin disease virus in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination.// *Transbound Emerg Dis.* 2018; 65(2): 491–496. DOI: 10.1111/tbed.12730.
107. Tuppurainen E.S., Pearson C.R., Bachanek-Bankowska K., Knowles N.J., Amareen S., Frost L., Henstock M.R., Lamien C.E., Diallo A. & Mertens P.P. Charac-

- terization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. Antiviral Research. 2014; 109: 1–6.
108. Кононов А.В., Спрыгин А.В., Кононова С.В., Нестеров А.А., Прутников П.В., Артиухова Е.Е., Кострова Е.С., Шумилова И.Н. Выявление генома вируса заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) КРС в полевых образцах от КРС на территории Российской Федерации. Ветеринария сегодня. 2018; (1): 29–32. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-1-29-32>.
109. Kononov A. et al. Detection of vaccine-like strains of lumpy skin disease virus in outbreaks in Russia in 2017. Arch. Virol. 2019; 164(6): 1575–1585. DOI: 10.1007/s00705-019-04229-6.
110. Sprygin A., Babin Yu., Pestova Y., Kononova S., Wallace D.B., van Schalwyk A., Byadovskaya O., Diev V., Lozovoy D., Kononov A. Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. PloS One. 2018; 13(12).
111. Lee S. W., Markham P.F., Coppo M.J., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H., Browning G.F., Ficorilli N., Hartley C.A., and Devlin J.M. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. Science. 2012; 337(6091): 188.

# БОЛЕЗНЬ ШМАЛЛЕНБЕРГ

Орлянкин Б.Г., Шевкопляс В.Н.

Болезнь Шмалленберг — новая вирусная болезнь крупного рогатого скота и мелких жвачных животных, характеризующаяся лихорадкой, диареей,abortами и рождением нежизнеспособного потомства с пороками развития.

**Этиология.** Возбудителем болезни является вирус Шмалленберг, относящийся к роду *Orthobunyavirus* семейства *Bunyaviridae*. Впервые он был выделен в 2011 году немецкими исследователями из крови больных коров, содержащихся на фермах вблизи города Шмалленберг, с использованием культуры клеток личинок *Culicoides varripennis* и ВНК-21 [13].

Вирионы вируса Шмалленберг представляют собой округлые частицы диаметром примерно 100 нм. Они состоят из трех нуклеокапсидов спиральной симметрии и липопротиновой оболочки, на поверхности которой имеются выступы длиной 5–10 нм, образованные гликопротеинами Gn и Gc. Последний индуцирует синтез вируснейтрализующих антител. Каждый нуклеокапсид состоит из нуклеокапсидного белка N, уникальной однонитевой геномной РНК и РНК-зависимой РНК-полимеразы [10].

Геном вируса Шмалленберг, подобно другим буньявирусам, состоит из трех сегментов минус-РНК, обозначаемых как L (большой), M (средний) и S (малый). Каждый сегмент РНК содержит уникальную последовательность нуклеотидов и существует в кольцевой форме за счет наличия комплементарных нуклеотидов на концах РНК. L-сегмент кодирует белок L — РНК- зависимую РНК-полимеразу; M-сегмент — два поверхностных гликопротеина (Gn и Gc) и неструктурный белок NS<sub>m</sub>; S-сегмент — нуклеокапсидный белок N и неструктур-

турный белок NS<sub>s</sub>. Последний подавляет синтез интерферона и развитие иммунного ответа [9, 10].

Геном этого вируса имеет высокую степень гомологии с геномами вирусов Акабане, Айно и Шамонда — представителями рода *Orthobunyavirus*, в котором имеется более 200 вирусов. Полагают, что вирус Шмалленберг — это реассортант, геном которого представлен L- и S-сегментами вируса Шамонда и M-сегментом вируса Сатупери серогруппы Симбу [21].

Вирус Шмалленберг хорошо размножается в перевиваемых культурах клеток ВНК-21 и Vero с развитием цитопатического эффекта. Чувствителен к жирорастворителям и детергентам, теряет или значительно снижает инфекционность при 50–60°C в течение 30 минут, инактивируется 1% раствором гипохлорита натрия, 2% раствором глютаральдегида и 70% этанолом. К вирусу чувствительны коровы, овцы и козы [13].

**Эпизоотология.** В течение двух лет после установления болезни Шмалленберг она была зарегистрирована в 27 европейских странах среди крупного рогатого скота, овец и коз. Основными путями передачи вируса являются трансмиссивный (с помощью кровососущих насекомых) и трансплацентарный (от матери к плоду). Мокрецы рода *Culicoides* являются главными переносчиками вируса. Случаи острой вирусной инфекции отмечены в период наибольшей распространенности мокрецов. Возможна также передача вируса с инфицированной спермой. Прямая передача вируса от животного к животному не установлена [5, 9, 18].

Распространение вируса Шмалленберг среди коров, овец и коз оценивают по

обнаружению специфических антител в сыворотке крови животных с помощью ИФА и реакции нейтрализации. Серопозитивных животных выявляют во многих обследованных хозяйствах в 40–98% случаев. Специфические антитела также обнаружены у оленей и кабанов [4, 9].

Антитела к вирусу Шмалленберг обнаружены у 18 видов диких и экзотических животных в двух зоопарках (Франция и Нидерланды) в 2011–2015 гг. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения роли зоопарковых животных в распространении вируса [15].

Человек нечувствителен к вирусу Шмалленберг и пробы сыворотки крови от людей из группы высокого риска (фермеры, ветеринарные специалисты) не содержат специфических антител [4].

В 2012 г. на 80-й сессии Всемирной организации по охране здоровья животных (ОИЕ) было сделано заключение, что болезнь Шмалленберг не рассматривается как опасная болезнь. Риск передачи вируса с молоком, мясом, семенем и эмбрионами незначительный.

**Патогенез.** В мокрецах рода *Culicoides* вирус Шмалленберг размножается и передается животным при кровососании. С кровью он разносится в различные органы и ткани, включая селезенку, лимфоузлы и лимфоидную ткань слизистых оболочек, в клетках которых он реплицируется. Методом ПЦР в реальном времени вирусный геном обнаружен в тканях этих органов [5, 9].

Вирус Шмалленберг проникает через плаценту и размножается в клетках эмбрионов и плодов. Пораженные эмбрионы погибают и рассасываются. Инфицирование плодов в период их иммунологической ареактивности (в первой половине беременности) приводит к нарушению их развития и гибели или рождению нежизнеспособного потомства. Иммунокомпетентные пло-

ды (вторая половина беременности) устойчивы к летальному действию вируса в результате синтеза вируснейтрализующих антител [1, 9, 19].

**Клинические признаки.** У коров при острой форме болезни отмечают лихорадку, потерю аппетита, диарею и снижение удоев молока до 50%. Длительность инкубационного периода обычно составляет 1–5 дней. Клинические признаки исчезают через несколько дней. У овец и коз заболевание протекает инаппарантно (бессимптомно). Инфицирование беременных животных (коров, овец, коз) приводит кabortам и рождению нежизнеспособного потомства с пороками развития. Наиболее распространенными являются артритрипоз (неподвижность суставов, укороченность сухожилий, скручивание шеи), шаткая походка, повышенная возбудимость и атаксия. Все эти изменения связаны с размножением вируса в нервных клетках. У небеременных животных заболевание часто протекает в инаппарантной форме [1, 2, 4, 9].

**Патологоанатомические изменения.** У мертворожденных телят, ягнят и козлят обнаруживают пороки развития: артритрипоз (контрактура суставов), кифоз (искривление позвоночника), лордоз (деформация позвоночника), гидроцефалию (водянка головного мозга), деформацию челюстей и гипоплаziю (недоразвитие) головного мозга. Гистологически выявляют воспаление головного и спинного мозга. Иммуногистохимически и гибридизацией *in situ* (в тканях) установлено, что нервные клетки являются мишениями для вируса [9, 16].

**Диагностика.** Окончательный диагноз на наличие в хозяйстве болезни Шмалленберг ставят по результатам лабораторных исследований, основанных на выделении вируса и обнаружении вирусной РНК. Для исследования используют пробы сыворотки крови, селезенки, лимфоузлов, головного мозга, тканей

плодов и мертворожденных животных. Выделение вируса в культуре клеток «золотой стандарт». Для изоляции вируса используют перевиваемые культуры клеток ВНК-21 и Vero. В последнее время для обнаружения вирусной РНК предпочтение отдается полимеразной цепной реакции в реальном времени, которая обладает высокой чувствительностью и высокой специфичностью [3, 5, 6, 8].

Специфические антитела в сыворотке крови животных обнаруживаются в реакции нейтрализации и методом иммуноферментного анализа с использованием в качестве антигена рекомбинантного нуклеокапсидного белка N [7, 17].

Обнаружение антител к вирусу Шмалленберг в сыворотке крови животного свидетельствует о его контакте с вирусом, но не является лабораторным подтверждением диагноза у данного животного. Для постановки диагноза на болезнь Шмалленберг необходимо лабораторное подтверждение наличия вируса или вирусного генома в организме животного.

В нашей стране разработаны «Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации болезни Шмалленберг» (2013 г.) и «Рекомендации по условиям ввоза, карантинирования и транзита восприимчивых к болезни Шмалленберг животных и их генетического материала из стран Европы на территорию Российской Федерации (2018 г.).

**Специфическая профилактика.** Специфическую профилактику болезни Шмалленберг осуществляют с помощью инактивированных и живых вакцин. Инактивированные вакцины безвредны и защищают животных от заболевания, однако они создают менее длительный и напряженный иммунитет, чем живые вакцины. Последние более эффективны, но не исключается реверсия патогенности у вакцинного вируса [12, 14, 20].

Для дифференциации иммунизированных и инфицированных животных была разработана субъединичная рекомбинантная вакцина на основе гликопротеина Gc вируса Шмалленберг, синтезированного в бакуловирусной системе экспрессии генов. Однако эта вакцина не защищала животных от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса [11].

## Литература

1. Луничин А.В., Сальников Н.И., Никитина Е.Г. и др. Болезнь Шмалленберг — новое заболевание жвачных в Европе. Ветеринария. 2012; 4: 23–26.
2. Никитина Е.Г., Сальников Н.И., Цыбанов С.Ж. и др. Болезнь Шмалленберг. Ветеринария. 2013; 4: 20–23.
3. Сальников Н.И., Никитина Е.Г., Жабон Е.О. и др. Выявление генома вируса болезни Шмалленберг методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Ветеринария. 2012; 8: 57–58.
4. Спрыгин А.В., Кононов А.В., Бабин Ю.Ю. и др. Болезнь Шмалленберг: молекулярно-биологические особенности и клиническая картина. Сельскохозяйственная биология. 2012; 6: 24–34.
5. Южаков А.Г., Богданова О.Ю., Гребенникова Т.В. и др. Результаты экспериментального заражения ягнят вирусом болезни Шмалленберг и разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления вирусной РНК. Ветеринария. 2015; 10: 21–26.
6. Bilk S., Sculze C., Fischer M. et al. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. Vet. Microbiol. 2012; 159: 236–238.
7. Breard E., Lara E., Comtet L. et al. Validation of commercially available indirect ELISA using a nucleocapsid recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. PLoS ONE. 2013; 8: e53446.

8. DeRegge N., Deblauwe I., DeDeken R. et al. Detection of Schmallenberg virus in different Culicoides spp. by real-time RT-PCR. *Transbound. Emerg. Dis.* 2012; 59: 471–475.
9. Doceul V., Lara E., Sailleau C. et al. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet. Res.* 2013; 44: 1–13.
10. Elliott R.M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12: 673–685.
11. Endalew A.D., Faburay B., Trujillo J.D. et al. Immunogenicity and efficacy of Schmallenberg virus envelope glycoprotein subunit vaccines. *J. Vet. Sci.* 2019; 20: e58.
12. Hechinger S., Wernike K., Beer M. Single immunization with an inactivated vaccine protects sheep from Schmallenberg virus infection. *Vet. Res.* 2014; 45: 79.
13. Hoffmann B., Scheuch M., Hoper D. et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18: 469–472.
14. Kraatz F., Wernike K., Hechinger S. et al. Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J. Virol.* 2015; 89: 1825–1837.
15. Laloy E., Braud C., Breard E. et al. Schmallenberg virus in zoo ruminants, France and Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22: 2201–2203.
16. Livart-Peterson K., Luttkholt S., Peperkamp K. et al. Schmallenberg disease in sheep or goats: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 2015; 181: 147–153.
17. Mansfield K.L., LaRocca S.A., Khatri M. et al. Detection of Schmallenberg virus serum neutralizing antibodies. *J. Virol. Methods.* 2013; 188: 139–144.
18. Rasmussen L.D., Kristensen B., Kirkeby C. et al. Culicoides as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18: 1204–1206.
19. Varela M., Schnettler E., Caporale M. et al. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the immune system of the host. *PLoS Patog.* 2013; 9: e1003133.
20. Wernike K., Nikolin V.M., Hechinger S. et al. Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. *Vaccine.* 2013; 31: 3558–3563.
21. Yanase T., Kato T., Aizawa M. et al. Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch. Virol.* 2012; 157: 1611–1616.

# БЕШЕНСТВО

Гулюкин А.М.

**Бешенство (Rabies)** представляет собой группу зооантропонозных заболеваний, вызываемых нейротропными вирусами рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae* порядка *Mononegavirales*, которые способны заражать млекопитающих животных всех видов и являться причиной развития смертельного энцефалита.

**Этиология.** Заболевание с клиническим проявлением бешенства может быть вызвано любым из видов вирусов, входящих в род *Lyssavirus*. По систематике, утвержденной Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) в 2019 году, в род *Lyssavirus* входит 17 видов: *Aravan lyssavirus*, *Australian bat lyssavirus*, *Duvenhage lyssavirus*, *Bokeloh bat lyssavirus*, *European bat 1 lyssavirus*, *European bat 2 lyssavirus*, *Lagos bat lyssavirus*, *Gannoruwa bat lyssavirus*, *Ikoma lyssavirus*, *Irkut lyssavirus*, *Khujand lyssavirus*, *Lleida bat lyssavirus*, *Mokola lyssavirus*, *Rabies lyssavirus*, *Shimoni bat lyssavirus*, *Taiwan bat lyssavirus*, *West Caucasian bat lyssavirus*. Генетически все виды *Rabies lyssavirus* находятся в относительной компартментации между собой, но, согласно филогенетическому анализу, все эти таксоны обладают общими предковыми корнями [1].

Сохранение генофонда каждого вида лиссавирусов происходит благодаря циркуляции внутри конспецифичной популяции животных, в которой происходит резервация и амплификация вирусов [2]. Видовой состав резервуарных животных предопределен биоценозом, в который встраивается популяция лиссавируса. Естественными биологическими резервуарами для большинства видов лиссавирусов являются представители рукокрылых (*Chiroptera*). Исключение составляет *Rabies lyssavirus*,

который обладает генетически детерминированными механизмами межвидового перехода, обеспечивающими быструю смену резервуарных хозяев вируса [3]. На определенном этапе своего эволюционного развития *Rabies lyssavirus* перешел от циркуляции исключительно в популяциях летучих мышей к интродукции в популяции наземных животных, преимущественно отряда хищных (*Carnivora*), что обеспечило его панетарное распространение [4, 5]. Для *Mokola lyssavirus* и *Ikoma lyssavirus* виды резервуарных хозяев к настоящему моменту еще точно не идентифицированы.

Вирионы *Rabies lyssavirus* обладают размером 100–300 Нм в длину и около 75 Нм в диаметре. Геном вируса бешенства представлен несегментированной отрицательной одноцепочечной РНК, содержащей около 12 тысяч последовательностей нуклеотидов, которая кодирует пять белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L – large protein). Пулеобразная вирусная частица состоит из двух структурных и функциональных блоков: внешней оболочки и рибонуклеокапсида.

G-белок и нуклеопротеин вируса бешенства являются основными антигенами, индуцирующими формирование специфического иммунного ответа. N-гликозилированный трансмембранный G-белок входит в состав внешней оболочки вириона совместно с липидным бислоем, получаемым из клетки-хозяина. Тримеры G-белка образуют шипообразные выступы на внешней оболочке, которые распознаются и связываются клеточными рецепторами, являясь од-

ним из ведущих факторов патогенности лиссавируса [6, 7, 8]. Нуклеопротеин вместе с РНК-полимеразой (L), её кофактором (P) и геномной РНК образуют спирально закрученный рибонуклеокапсид (РНП), который обеспечивает транскрипцию и репликацию генома в цитоплазме [9]. N-ген, кодирующий последовательность аминокислот нуклеопротеина, характеризуется низким уровнем изменчивости, что используется для проведения филогенетического анализа полевых изолятов вируса и установления времени дивергенции изучаемых геновариантов [10]. Матриксный белок (M) располагается между рибонуклеокапсидом и оболочкой вириона и участвует в вирусной транскрипции, репликации, сборке и почковании, обеспечивает пулевидную морфологию вируса [11, 12].

Вирусные частицы бешенства нестабильны вне биологического хозяина, инактивируются подавляющим большинством дезинфицирующих средств, УФ-лучами, при нагревании до 60°C инактивируются через 10 мин., при 100°C — мгновенно. В гниющем материале вирус бешенства инактивируется через 2–3 недели. При отрицательных температурах вирус перестает разрушаться и может сохраняться в тканях мозга погибших животных длительное время.

**Патогенез и клинические признаки.** Основной механизм передачи *Rabies lyssavirus* контактный при укусах, наносимых больными животными, что обеспечивает трансдермальное проникновение вируса, но также возможна передача инфекции при попадании слюны больного животного на поверхность слизистой оболочки или свежую рану на коже [13]. Из места первичного проникновения вирус бешенства внедряется в аксон нейрона через немиелинизированную терминал [14, 15, 16]. После внедрения в аксон нейрона вирус бешенства начинает пассивно продвигаться со скоростью от 1

до 40 см в сутки по направлению к отделам центральной нервной системы с использованием механизмов ретроградного аксоноплазматического транспорта [17, 18, 19, 20, 21]. Эта стадия проникновения и центростремительного продвижения лиссавируса по периферической нервной системе приходится на инкубационный период болезни и характеризуется полным отсутствием виремии, что позволяет вирусу избежать контактов с иммунокомпетентными клетками [22, 23, 24]. На этой стадии инфекционная эстафета с передачей вируса другому биологическому хозяину невозможна, и в случае проведения антирабической иммунизации возможна элиминация вирусных частиц еще до достижения ими отделов центральной нервной системы, что предотвращает развитие клинических признаков болезни. Продолжительность инкубационного периода при бешенстве находится в прямой зависимости от локализации и характера инфицирующего укуса, вирулентности штамма и колеблется, как правило, от 2 недель до 3 месяцев, но может достигать нескольких лет [25, 26].

При достижении отделов ЦНС вирус бешенства переходит к интенсивной репликации, вызывает быстро прогрессирующие патологические процессы в нервной ткани, что приводит к развитию клинической стадии болезни. Провоцируемый вирусом бешенства энцефаломиелит характеризуется острым течением, ведет к формированию мозговой дисфункции, девиантного поведения, общей вялости, атаксии, затрудненного дыхания, гиперсаливации, гидрофобии, фотофобии, дисфагии, агрессии, развития судорог и параличей, приводящих к остановке дыхания и сердечной деятельности в терминальной стадии. У крупного рогатого скота, как и у других видов животных, клинические проявления бешенства могут отличаться в каждом конкретном случае и по комплексу симптомов подра-

зделяются на буйную и паралитическую формы, что связано со стадиями развития энцефалита. Кроме общих неврологических нарушений у животных отмечают нарушение рефлекса молокоотдачи, повышение половой возбудимости, атонию рубца, метеоризм, спазмы брюшных мышц [27].

С началом стадии репликации в отделах головного мозга вирус бешенства начинает центробежно распространяться с использованием антероградного аксонального транспорта, попадая в мышечную ткань, надпочечники, почки, печень, сетчатку, роговицу глаза, поджелудочную железу, стенки крупных сосудов, а также секреторные железы, включая слюнные, слезные и сальные [28, 4, 29]. Начало явного проявления клинических признаков болезни может отставать от момента появления вирусных частиц бешенства в слюне инфицированного животного, но данная задержка не превышает 10 дней [30]. После развития клинических признаков бешенства гибель животных в большинстве случаев происходит в короткий срок, не превышая период 5–6 дней. Летальность при бешенстве составляет 100% [31, 32].

**Эпизоотология.** Характер эпизоотического процесса бешенства предопределяется географией обитания и биологическими особенностями видов животных, являющихся резервантами рабиического вируса [33]. Для сельскохозяйственных животных наибольшую опасность представляют эпизоотии бешенства, распространяемые наземными хищниками. Наиболее стабильная и эффективная резервация *Rabies lyssavirus* происходит в популяциях хищных животных семейства псовых (*Canidae*), что обеспечивается экологическими и этологическими особенностями животных этих видов. В зависимости от географии распространения резервация вируса также возможна в популяциях животных семей-

ства скунсовых (*Mephitidae*), енотовых (*Procyonidae*), куньих (*Mustelidae*) и мангустовых (*Herpestidae*) [34, 35, 36].

На территории Российской Федерации с середины XX века доминируют эпизоотии бешенства природного (сильватического) типа с циркуляцией вируса *Rabies lyssavirus* в популяции рыжей лисицы (*Vulpes vulpes*) [34, 37, 38]. Одновременно в ряде регионов Российской Федерации лисье бешенство сопровождается параллельным резервированием вируса в других видах семейства псовых, с которыми лисица делит экологические ниши. Наиболее часто происходит одновременная колонизация рабиическим вирусом популяций лисиц и енотовидных собак [39].

Эпизоотии бешенства, протекающие в популяции домашних собак (*Canis lupus familiaris*), потенциально представляют наибольшую опасность для человека и домашних животных, так как связаны с животными — компаньонами человека, находящимися в непосредственной близости. Наиболее интенсивные эпизоотии бешенства собачьего (антропургического) типа регистрируются в странах Азии и Африки, являясь причиной гибели 50 000–60 000 человек каждый год [40]. В Российской Федерации, благодаря массовой вакцинации мелких домашних животных и проведению мероприятий по уменьшению численности безнадзорных животных, бешенство среди собак как самостоятельный автономный эпизоотический процесс не регистрируется.

На территории Американского континента часто регистрируются случаи бешенства крупного рогатого скота в результате укусов вампировых летучих мышей, входящих в подсемейство *Desmodontinae* [41]. Вампировые летучие мыши широко распространены в областях Центральной и Южной Америки, но на территории Евразии не встречаются. На Европейском континенте эпизоотии, связанные с лиссавирусами, вызываются несколь-

кими видами вирусов, но в большинстве случаев при лабораторных исследованиях обнаруживают European bat lyssavirus 1 и 2 типа (EBLV-1, EBLV-2), которые циркулируют в популяциях насекомоядных летучих мышей *Eptesicus serotinus*, *Myotis daubentonii*, *Myotis dasycneme*. Насекомоядные мыши крайне редко вступают в прямой контакт с сельскохозяйственными животными и людьми, благодаря чему риск передачи ими лиссавирусов оценивается как очень низкий. За период наблюдений, длился в Европе несколько десятилетий, были отмечены только единичные случаи заражения лиссавирусами людей [42].

Все случаи бешенства среди человека и сельскохозяйственных животных возникают в результате «эффекта перелива» (*spillover effect*) эпизоотий, протекающих в популяциях резервуарных видов, не имеют инфекционного продолжения и являются биологическим тупиком для лиссавирусов [43]. При этом случаи заболевания сельскохозяйственных животных являются маркером интенсивности эпизоотического процесса в дикой природе.

В Российской Федерации современная эпизоотическая ситуация по бе-

шенству оценивается как напряженная. По данным Департамента ветеринарии МСХ, за период 2004–2019 гг. в Российской Федерации в среднем ежеквартально регистрировалось 820 случаев заболевания животных бешенством, с колебанием показателя в границах от 256 до 2134 [44]. Большой диапазон амплитуды изменений заболеваемости животных связан с процессами сезонности и цикличности эпизоотий природного типа и обусловленных изменениями численности и миграционными процессами в популяциях резервуарных животных [45, 46, 47]. Согласно запро- сам на выборку в «Базе данных неблагополучных пунктов и случаев забо-леваемости бешенством в Российской Федерации» [48], около 2/3 от всех сов-ременных вспышек бешенства прихо-дятся на европейскую часть Российской Федерации, с наиболее интенсивным распросстранением болезни в регио-нах, входящих в состав Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов. Наибольшее число случаев бе-шенства крупного рогатого скота прихо-дится на территорию двух федеральных округов РФ — Центрального и При-волжского.

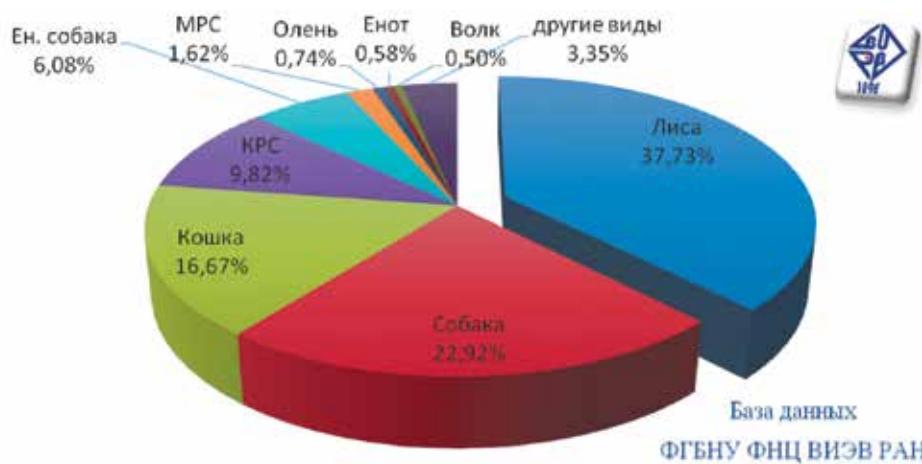


Рис. 1. Долевое распределение случаев заболеваемости бешенством по видам животных в Российской Федерации (по данным за 2013–2019 гг.)

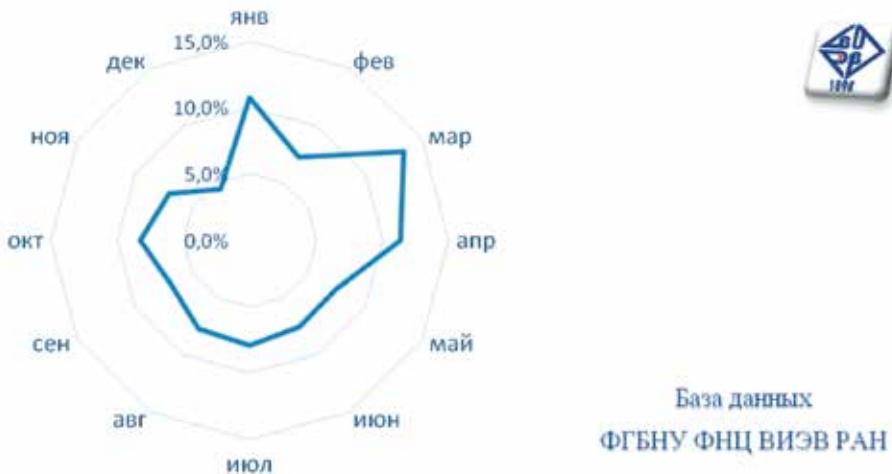


Рис. 2. Сезонность заболеваемости бешенством крупного рогатого скота в Российской Федерации (по данным за 2013–2019 гг.)

По интенсивности вовлечения в эпизоотический процесс бешенства на территории Российской Федерации крупный рогатый скот находится на четвертом месте, лидируя по числу случаев среди животных нехищных видов.

Динамика годовой и квартальной заболеваемости бешенством крупного рогатого скота в неблагополучных регионах находится в прямой корреляции с динамикой заболеваемости диких плотоядных животных. Характерной особенностью проявления эпизоотии среди крупного рогатого скота является выраженная сезонность с пиком заболеваемости в марте.

Выраженный подъем заболеваемости бешенством крупного рогатого скота в марте является инерционно смешенным последствием зимнего подъема заболеваемости хищников в дикой природе, который индуцируется всплеском внутрипопуляционных контактов у лисиц в период гона, что позволяет рассматривать конец зимы как время наибольшего риска заражения крупного рогатого скота бешенством.

**Диагностика.** Согласно «Ветеринарным правилам осуществления профилактиче-

ских, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов бешенства», утвержденных приказом Минсельхоза России от 25.11.2020 № 705, лабораторные исследования проб патологического материала проводятся с использованием следующих методов: метода флуоресцирующих антител (МФА), метода иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), реакции диффузационной препарации (РДП). В случае получения отрицательного результата методами МФА, ИФА, ПЦР, РДП дополнительно проводятся лабораторные исследования методом постановки биологической пробы на белых мышах или методом выделения возбудителя в культуре клеток мышиной нейробластомы CCL-131 или невриномы гассерова узла крысы — НГУК-1.

Диагноз на бешенство считается установленным в одном из следующих случаев:

- выявлен антиген возбудителя;
- обнаружен генетический материал возбудителя;

— выделен возбудитель в культуре клеток;

— получен положительный результат биологической пробы на белых мышах.

Метод флуоресцирующих антител считается «золотым стандартом» диагностики бешенства благодаря высокой чувствительности, специфичности и быстроте постановки. В МФА проводится выявление в образцах патологического материала антигена вируса бешенства путем использования меченых флуоресцеинизотиоцианатом антирабических антител, которые образуют характерные светящиеся комплексы-включения, обнаруживаемые в поле зрения люминесцентного микроскопа.

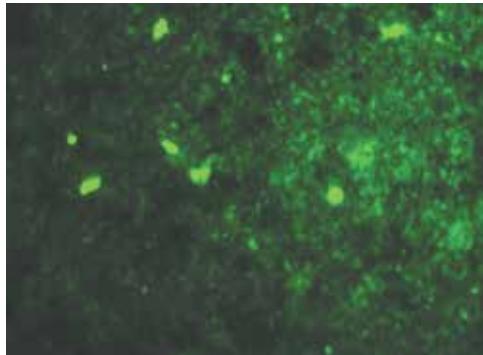


Рис. 3. Фотофиксация в МФА образца головного мозга

Метод иммуноферментного анализа основывается на специфическом взаимодействии антигена вируса с антирабическим антителом, иммобилизованном на твердом носителе, и последующим выявлении связавшегося антигена с помощью второго меченного ферментом антитела путем окрашивания продукта реакции хромогеном.

Для выявления в образцах вирусной РНК и генотипирования изолятов применяют метод обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), позволяющий выявлять геном вируса бешенства путем перевода специфической последовательности РНК ви-

руса в ДНК с последующим многократным копированием полученной ДНК и обнаружением продуктов реакции, осуществляемый *in vitro*.

Биопроба проводится путем введения белым мышам суспензии патологического материала с последующей идентификацией вируса методом флуоресцирующих антител. Пять-шесть белых мышей заражают 10%-ной суспензией патологического материала интрацеребрально в объеме 0,02–0,03 см<sup>3</sup>. Наблюдение за животными проводят не менее 30 дней. Метод считается одним из наиболее чувствительных и достоверных при лабораторной диагностике бешенства [49]. Недостатками биопробы являются длительность исследования, потенциальная биологическая опасность в связи с работой с зараженными животными, невозможность использования разложившегося биоматериала, высокая трудоемкость и стоимость проведения исследований, этические вопросы о негуманном отношении к лабораторным животным [50].

Метод выделения вируса бешенства в культуре клеток мышиной нейробластомы CCL-131 (или невриномы гассерова узла крысы — НГУК-1) основан на размножении вируса в культуре клеток и его идентификации методом флуоресцирующих антител. Тест в культуре клеток рассматривается как контрольный, подтверждающий результаты МФА, и рассматривается как альтернатива биопробы с эквивалентными результатами (совпадение 93,8%) [51]. Учитывая, что продолжительность анализа составляет от 2 до 3 суток, это позволяет значительно ускорить получение результата в сравнении с 30-дневным сроком при биопробе [47].

Реакция диффузационной преципитации (РДП) характеризуется простотой постановки и основывается на способности антирабических антител и образца

с антигеном вируса бешенства встречаю-  
но диффундировать в агаровом геле и при  
специфическом взаимодействии образо-  
вать комплекс «антиген–антитело», наблю-  
даемый невооруженным глазом в виде линии преципитации. РДП  
относится к тестам с низкой чувстви-  
тельностью, выявляя вирусный антиген  
лишь при его концентрации в исследуемом  
материале не менее  $4,5 \text{ Ig LD}_{50}$ , из-  
за чего при отрицательных результатах  
РДП бешенство нельзя исключить [27].

Широко использовавшийся ранее ме-  
тод световой микроскопии отпечатков  
мозга, основанный на поиске цитоплаз-  
матических включений — телец Бабе-  
ша–Негри (Babes–Negri) в настоящий  
момент не входит в число рекомендован-  
ных методов лабораторной диагностики  
бешенства из-за низкой чувствительно-  
сти (которая составляет 40–73%) [27].

Для исследования на бешенство, со-  
гласно действующим Ветеринарным  
правилам, в лабораторию от крупных  
животных направляется голова, жи-  
вотные весом до 15 кг направляются  
целиком.

В лаборатории из патологического  
материала от крупного рогатого скота  
для исследования отбирают кусочки  
тканей из каждого отдела головного  
мозга (аммонова рога, мозжечка, коры  
больших полушарий, продолговатого  
мозга) размером 0,5–1,0 см.

Для исследования МФА, постановки  
биопробы и методом выделения вируса  
бешенства в культуре клеток (мышиной  
нейробластомы CCL-131 или НГУК-1)  
пригодны только свежие пробы ткани  
головного мозга.

Для исследований проб мозга живот-  
ных в стадии разложения и контамини-  
рованных бактериальной микрофлорой  
используют РДП или ОТ-ПЦР.

**Специфическая профилактика.** В Рос-  
сийской Федерации для профилактики  
бешенства у домашних и сельскохозяйст-

венных животных применяются только  
инактивированные культуральные анти-  
рабические вакцины из фиксированных  
штаммов вируса бешенства. Согласно  
«Государственному реестру лекарствен-  
ных средств для ветеринарного примене-  
ния» для профилактики и вынужденной  
иммунизации сельскохозяйственных  
животных в Российской Федерации за-  
регистрированы вакцины, изготавли-  
ваемые из следующих штаммов вируса  
бешенства: Щелково-51, ТС-80, 71 Бел-  
НИИЭВ-ВГНКИ, Pasteur RIV, PV-Paris.  
Для крупного рогатого скота в Россий-  
ской Федерации наиболее массово при-  
меняются вакцины, изготовленные с ис-  
пользованием штамма Щелково-51.

Учитывая природно-очаговый харак-  
тер эпизоотий бешенства на территории  
Российской Федерации, важнейшим  
элементом противоэпизоотической ра-  
боты является вакцинация и регуляция  
численности диких животных семейства  
псовых. Оральная вакцинация диких  
плотоядных позволила ликвидировать  
бешенство лисьего типа в Западной Ев-  
ропе к началу XXI века [52, 1]. Для ораль-  
ной вакцинации диких плотоядных ис-  
пользуются живые вакцины, которые  
представляют собой пищевые брикеты,  
содержащие внутри капсулу с вакциной  
с добавлением антибиотика тетрацикли-  
нового ряда в качестве биомаркера для  
контроля поедаемости вакцины. В Рос-  
сийской Федерации наиболее массово  
применяются вакцины, которые изго-  
тавливаются из культурального живого  
аттенуированного штамма «PB-97».

## Литература

- Rupprecht C.E., Hanlon C.A., Slate D. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. Dev. Biol. 2004; 119: 173–184.

2. Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Макаров В.В., Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Полякова И.В., Южаков А.Г. Особенности эпизоотологического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области. Вопросы вирусологии. 2018; 63: 115–123.
3. Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., Vignuzzi M., Duchene S., Holmes E.C., Bourhy H. Two major types of rabies that evolved in different ways. Available: <https://www.pasteur.fr/en/research-journal/news/two-major-types-rabies-evolved-different-ways>.
4. Львов Д.К. и др. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д.К. Львова М.: Медицинское информационное агентство, 2013.
5. Макаров В.В., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Бешенство: естественная история на рубеже столетий. М.: ЗооВетКнига, 2015.
6. Lawson D.M., Artymiuk P.J., Yewdall S.J., Smith J.M., Livingstone J.C., Trefry A., Luzzago A., Levi S., Arosio P., Cesareni G., Thomas C.D., Shaw W.V., Harrison P.M. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. Nature. 1991; 349: 541–544.
7. Ross B.A., Favi C.M., Vásquez V.A. Rabies virus glycoprotein: structure, immunogenicity and pathogenic role. Rev Chilena Infectol. 2008; 25(2): 14–18.
8. Gnanadurai C.W., Lyon D.C., Jackson A.C., Fu Z.F. Mononegaviruses of veterinary importance: pathobiology and molecular diagnosis. Ed. CAB International. 2013; 209–229.
9. Plotkin S.A. Rabies. Clinical Infectious Diseases. 2000; 30(1): 4–12.
10. Девяткин А.А., Лукашев А.Н., Полещук Е.М., Ткачёв С.Е., Дедков В.Г., Сидоров Г.Н., Щелканов М.Ю., Галкина И.В., Карганова Г.Г., Гаврило М.В., Шипулин Г.А. Молекулярная эпидемиология вируса бешенства на территории Российской Федерации. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2017; 16(1): 39–42.
11. Finke S., Conzelmann K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. Journal of virology. 2003; 77(22): 12074–12082.
12. Pulmanausahakul R., Li J., Schnell M.J., Dietzschold B. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. Journal of virology. 2008; 82(5): 2330–2338.
13. Finke S., Conzelmann K.K. Replication strategies of rabies virus. Virus Res. 2005; 111: 120–131.
14. Murphy F.A., Bauer S.P. Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system. Intervirology. 1974; 3: 256–268.
15. Charlton K.M., Nadin-Davis S., Casey G.A., Wandeler A.I. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. Acta Neuropathologica. 1997; 94(1): 73–77.
16. Jackson A.S. Rabies: scientific basis of the disease and its management. Oxford: Academic Press. 2013.
17. Tsiang H. Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. Journal of neuropathology and experimental neurology. 1979; 38.
18. Kristensson K. Implications of axoplasmic transport for the spread of virus infections in the nervous system. Axoplasmic Transport in Physiology and Pathology. 1982; 153–158.
19. Kucera P., Dolivo M., Coulon P., Flamand A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. Journal of virology. 1985; 55: 158–162.

20. Lycke E., Tsiang H. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *Journal of virology*. 1987; 61: 2733–2741.
21. Dietzschold B., Li J., Faber M., Schnell M.J. Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future virology*. 2008.
22. Shankar V.S., Dietzschold B., Koprowski H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *Journal of virology*. 1991.
23. Baloul L., Lafon M. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie*. 2003; 85(8): 777–788.
24. Mahadevan A., Suja M.S., Mani R.S., Shankar S.K. Perspectives in diagnosis and treatment of rabies viral encephalitis: insights from pathogenesis. *Neurotherapeutics*. 2016; 13: 477–492.
25. Gribencha S.V., Gribanova L.Y., Malkov G.B., Barinsky I.F. Population structure of some street rabies virus strains. *Archives of Virology*. 1989; 104: 347–350.
26. Smith J.S., Fishbein D.B., Rupprecht C.E., Clark K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. 1991; 324: 205–211.
27. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. М.: Аквариум, 2001.
28. Murphy F.A. Rabies pathogenesis. *Archives of Virology*. 1977; 54: 279–297.
29. Хисматулина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г., Александрова Н.М., Самерханов И.И., Алипер Т.И. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика. Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 18–24.
30. Hemachudha T., Ugolini G., Wacharapluesadee S., Sungkarat W., Shuangshoti S., Laothamatas J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet. Neurol*. 2013; 12(5): 498–513.
31. Feder Jr. H.M., Petersen B.W., Robertson K.L., Rupprecht C.E. Rabies: still a uniformly fatal disease? Historical occurrence, epidemiological trends, and paradigm shifts. *Current Infectious Disease Reports*. 2012; 14(4): 408–422.
32. Banyard A.C., Tordo N. Rabies pathogenesis and immunology. *Revue Scientifique et Technique*. 2018; 35(2): 323–330.
33. Сидоров Г.Н., Полещук Е.М., Сидорова Д.Г. Природные очаги бешенства в России в XX-начале XXI веков. *Ветеринарная патология*. 2004; 3: 86–101.
34. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика бешенства. М.: Медицина, 1985.
35. Таршис М.Г., Ковалев Н.А., Кузнецов П.П. Бешенство животных. Минск: Урожай, 1990.
36. Herwijnen R.V., Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Хисматулина В.А., Цареградский П.Ю., Паршикова А.Ю. Обзор эпизоотической ситуации бешенства, сложившейся в Российской Федерации в 2014 году. *Ветеринария и кормление*. 2015; 2: 19–23.
37. Веденников В.А., Шабейкин А.А., Харкевич А.А., Гулюкин А.М., Клементьева Н.А., Седов В.А., Коломыцев С.А. Обзор эпизоотической ситуации бешенства в Российской Федерации в 2000 году и прогноз на 2001 год. *Ветеринарная патология*. 2002; 1: 52–58.
38. Симонова Е.Г., Сабурова С.А., Левина К.Ю., Шабейкин А.А., Раич С.Р., Ладный В.И. Современная ситуация и основные направления борьбы и профилактики бешенства в Российской Федерации. *Лечебный врач*. 2019; 6: 74.
39. Макаров В.В. Современные представления о бешенстве. *Вестник охотоведения*. 2018; 15(3): 215–227.
40. Hellert J., Buchrieser J., Larrous F., Minola A., de Melo G.D., Soriaga L., England P., Haouz A., Telenti A., Schwartz O., Corti D., Bourhy H., Rey F.A. Rabies: new prophylactic and therapeutic avenues. 2020. Available: <https://www.pasteur.fr/en/research-journal/news/rabies-new->

- prophylactic-and-therapeutic-avenues.
41. Kobayashi Y., Sato G., Mochizuki N., Hirano S., Itou T., Carvalho A.A., Albas A., Santos H.P., Ito F.H., Sakai T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Veterinary Research*. 2008; 44.
  42. Rabies-Bulletin-Europe. Rabies-Bulletin-Europe. 2019. Available: <https://who-rabies-bulletin.org/>.
  43. Макаров В.В., Воробьев А.А. Актуальные проблемы бешенства: природная очаговость, методология исследования и контроля в центре России. *Ветеринарная патология*. 2004; 10(3): 102–106.
  44. Эпизоотическая ситуация в РФ по материалам Информационно-аналитического центра. Available: <https://fsvps.gov.ru/>.
  45. Веденников В.А. Дис. ... д-ра вет. наук. М., 1987.
  46. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. Информационно-аналитический бюллетень. Омск: ООО «Полиграфический центр КАН». 2013.
  47. Гулюкин А.М. Бешенство. Современная система анализа и контроля эпизоотического процесса на территории Российской Федерации. СПб., 2017.
  48. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Паршикова А.В., Симонова Е.Г., Левина К.Ю. База данных неблагополучных пунктов и случаев заболеваемости бешенством в Российской Федерации. Патент RU 2019621893. 2019.
  49. Atanasiu P. Animal inoculation and the Negri body. *The Natural History of rabies*. New York: academic Press. 1975; 1: 373.
  50. Хисматулина Н.А., Юсупов Р.Х., Селимов М.А., Янбарисова С.Р. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве. *Вопросы вирусологии*. 2001; 5: 25–48.
  51. Portnoi D., Favre S., Sureau E.P. Use of Neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of street rabies virus from field specimen Department of Health. Human Services Public Health Service Center for Disease Control. USA. 1982; 35–36.
  52. Stöhr K., Meslin F.M. Progress and setbacks in the oral immunisation of foxes against rabies in Europe. *Vet. Rec.* 1996; 139(2): 32–35.

# ЗЛОКАЧЕСТВЕННАЯ КАТАРАЛЬНАЯ ГОРЯЧКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Мищенко В.А., Мищенко А.В.

Злокачественная катаральная горячка (ЗКГ) — остропротекающее вирусное заболевание, поражающее в основном жвачных животных и реже свиней, проявляющееся в виде разнообразного комплекса поражений и характеризующееся высокой летальностью.

Впервые данную болезнь под названием «тиф крупного рогатого скота» описал Анкар в 1832 г. Болезнь регистрируется во всем мире. В России злокачественную горячку подробно описал в 1832 г. И.И. Равинович. Заболевание проявляется спорадическими случаями и ограниченными энзоотическими вспышками. Экономический ущерб от болезни в целом по странам незначительный из-за малого поражения крупного рогатого скота. Однако в отдельных хозяйствах вспышка ЗКГ наносит значительный экономический ущерб в связи с высокой летальностью (50–90%). Злокачественная катаральная горячка получает все большее признание в качестве причины существенных экономических потерь не только в хозяйствах, занимающихся разведением и откормом крупного рогатого скота, но в хозяйствах, содержащих другие восприимчивые виды [41].

**Этиология.** Возбудителем злокачественной катаральной горячки являются ДНК-содержащие вирусы, относящиеся к подсемейству *Gammaherpesvirinae* рода *Macavirus* семейства *Herpesviridae* [13, 14, 24]. Вирус ЗКГ впервые был выделен в 1953 г. Возбудитель ЗКГ был идентифицирован как герпесвирус в 1964 г. Наиболее полно описаны из них являются герпесвирус-1 буйволов (AlHV-1) [15] и герпесвирус-2 овец (OvHV-2) [16]. Болезнь, вызываемая

AlHV-1, в основном встречается в Африке к югу от Сахары и ограничивается географическими регионами, где скот пасется с антилопами гну. Герпесвирус-2 овец распространен во всем мире. Российские исследователи считают, что возбудителем, вызывающим злокачественную катаральную горячку на территории республик бывшего СССР, является герпес КРС 3 типа [2, 3, 11, 12]. Выделены вирусы, вызывающие заболевание у белохвостого оленя, горного козла [24, 27]. Вирус, подобный AlHV-2, выделен от хартбестом Джексона [28], антилоп [25], орикса, овцебыка и аудада [50].

При ряде вспышек ЗКГ из проб материала от оленей Сика был выделен герпесвирус-2 коз (CpHV-2) [30, 31]. Основываясь на филогенетическом анализе относительно консервативной части гена ДНК герпесвирусов, вызывающих ЗКГ, идентифицированных на сегодняшний день, можно разделить на две основные группы:

1) группа *Alcelaphinae/Hippotraginae*, которая включает AlHV-1, AlHV-2, вирус герпетического герпеса 1 (HiHV-1) и MCFV, переносимые ориксом;

2) группа Caprinae, включая OvHV-2, CpHV-2, MCFV-WTD и MCFV, переносимые горными козлами, овцебыками и аудадом [29, 50].

Вирусы внутри группы обладают определенными биологическими свойствами: например, вирусы группы *Alcelaphinae/Hippotraginae* могут размножаться в культуре клеток, а недавнее исследование передачи CpHV-2 среди коз показало, что CpHV-2 имеет сходный с OvHV-2 характер передачи [31, 41].

При электронной микроскопии ви-  
рussодержащей суспензии были выяв-  
лены вирусные частицы диаметром 140–  
220 нм с внешней оболочкой и централь-  
ным капсидом [5, 8].

Герпесвирус КРС чувствителен к различным физико-химическим факторам и устойчив при pH 5,5–8,5. Возбудитель быстро инактивируется солнечным светом. Вирус чувствителен к хлороформу и эфиру. Связанный с клетками вирус сохраняется во внешней среде 72 часа [5, 8]. Возбудитель ЗКГ размножается в первично-трипсинизированных культурах клеток почки, селезенки, легких, тимуса и надпочечников эмбриона КРС и овцы [42]. В клетках Vero вирус ЗКГ вызывает образование синцития и округления клеток [5, 11].

**Эпизоотология.** Болезнь чаще всего поражает животных подсемейства *Bovinae* и семейства *Cervidae*, но также встречается у домашних свиней, а также жирафов и видов антилоп, относящихся к подсемейству *Tragelaphinae*. Естественными хозяевами вирусов AIHV-1 являются антилопы гну (виды *Connochaetes* подсемейства *Alcelaphinae*), у которых он вызывает субклиническую инфекцию [8, 28]. Резервуаром OvHV-2 являются домашние и дикие овцы [51]. В Норвегии были зафиксированы поражения ЗКГ у домашних свиней, которые были подтверждены обнаружением вирусной ДНК у заболевших животных [40]. При экспериментальном заражении свиней OvHV-2 клинические признаки у заболевших свиней были очень похожи на те, которые наблюдаются при остром течении ЗКГ у крупного рогатого скота [26].

Установлено, что доза вируса не влияет на тяжесть поражения после клинического развития ЗКГ [46], но коррелирует с инкубационным периодом и временем первого обнаружения вирусной ДНК с помощью полимеразной

цепной реакции в лейкоцитах периферической крови [22].

Существует заметная градация восприимчивости к форме OvHV-2 ЗКГ, начиная от относительно устойчивых *Bos taurus* и *B. indicus*, водных буйволов, североамериканских бизонов и многих видов оленей до чрезвычайно восприимчивого оленя Пера Давида и бантенгов. Экспериментальные исследования на крупном рогатом скоте, бизонах и овцах показывают, что восприимчивость различных видов жвачных к инфекции OvHV-2 и AIHV-1 значительно различается. В условиях хозяйств овцы при циркуляции OvHV-2 не имеют клинических проявлений после заражения, хотя экспериментально доказано, что большие дозы OvHV-2 вызывали клинические признаки поражения ЗКГ при инокуляции овцам [32]. Бизоны примерно в 1000 раз более восприимчивы к заражению OvHV-2, чем крупный рогатый скот [37, 52]. Разница в восприимчивости к OvHV-2 между зубрами и домашними овцами составляет более шести порядков [32]. Хотя ЗКГ обычно приводит к летальному исходу при появлении клинических признаков, особенно у бизонов, крупного рогатого скота и некоторых видов оленей, может возникнуть субклиническая инфекция. Были зарегистрированы субклинические инфекции вирусом группы ЗКГ у бизонов, оленей и крупного рогатого скота [33, 49].

Экспериментальное заражение крупного рогатого скота и бизонов OvHV-2 аэрозольным путем подтверждает, что клинически восприимчивые хозяева могут быть инфицированы субклинически [51, 52].

ЗКГ может возникать везде, где существует резервуарный хозяин и в непосредственной близости находятся клинически восприимчивые животные. Передача вируса от резервуарных хозяев к клинически восприимчивым хозяевам

была относительно хорошо определена для AIHV-1 и OvHV-2 [20]. Оба вируса попадают в окружающую среду с носовыми и, возможно, глазными выделениями [38, 43]. Клинически восприимчивые виды животных заражаются вирусом при вдыхании и поедании контаминированных вирусом кормов и воды. Возбудитель может распространяться на большие расстояния, но не передается естественным путем от одного клинически восприимчивого хозяина к другому, так как пораженные животные являются тупиковыми хозяевами [17, 37, 48]. Практически у всех резервуарных хозяев собственные вирусы ЗКГ, но при определенных условиях может возникнуть ЗКГ, вызванная другими вирусами [1, 12, 14]. Инфекция у резервуарных хозяев обычно носит субклинический характер, хотя ЗКГ-подобная болезнь редко встречается у овец и коз [32].

Эпизоотология AIHV-1 и OvHV-2 в популяции естественных хозяев относительно хорошо изучена, но эпизоотический процесс при AIHV-1 значительно отличается от OvHV-2 [20, 47]. У антилоп гну происходит как горизонтальная, так и вертикальная передача. Часть телят антилоп гну рождается инфицированными трансплацентарным путем, однако большинство телят заражается горизонтальным путем. Интенсивное распространение вируса от гну происходит преимущественно в течение первых 90 дней жизни через глазные и носовые выделения [43, 48]. Нейтрализующие антитела развиваются примерно к 3-месячному возрасту, после чего выделение вируса резко снижается. Взрослые гну выделяют относительно низкий уровень вируса, за исключением периодов стресса или родов [15]. ЗКГ антилоп гну происходит сезонно во время отела [47], а вирус выделяют от телят антилопы гну в возрасте примерно до 4 месяцев [42].

Ягнята могут быть инфицированы в раннем возрасте [16]; как и телята антилоп гну, большинство ягнят не заражаются до достижения 2-месячного возраста в естественных условиях стада [35]. Если ягнята прекращают контактировать с инфицированными овцами до достижения этого возраста, они остаются неинфицированными [34], что подтверждает вертикальную передачу OvHV-2. Заражение ягнят во многом связано с дозой вируса при первом контакте [36]. Молодые ягнята и взрослые овцы передают вирус преимущественно через носовые выделения. Ягнята в возрасте от 6 до 9 месяцев распространяют вирус чаще и интенсивнее, чем на любом другом этапе жизни. Отсутствует корреляция между временем окота и распространением вируса в популяции взрослых овец [38], поэтому вероятность передачи от взрослых овец относительно стабильна и невысока круглый год. Небольшое увеличение ЗКГ весной во время сезона ягнения может отражать факторы, отличные от уровней распространения вируса, такие как климатические условия и сезонные колебания плотности поголовья, которые могут влиять на интенсивность воздействия.

Об эпизоотологии других вирусов в группе ЗКГ известно немного. Важно отметить, что встречающиеся в природе ЗКГ при смешанных операциях с участием нескольких видов, таких как зоопарки, государственные ярмарки, парки дикой природы и охотничьи хозяйства, связанны с резервуарными хозяевами: козы ответственны за ЗКГ, индуцированные CpHV-2 у пятнистых оленей [19], также белохвостый олень [39] и вилорогие антилопы и горный козел были ответственны за несколько случаев ЗКГ у бонго и аноа [46].

**Патогенез.** Злокачественную катаральную горячку относят к смертельным лимфопролиферативным заболеваниям [3, 4, 5, 7]. Возбудитель злокачественной катаральной горячки широко распро-

странен среди овец в виде субклинической формы болезни, являясь причиной заболевания в большинстве регионов мира. Ягната и молодняк до 9-месячного возраста больше распространяют возбудитель ЗКГ, чем взрослые овцы. Возбудитель злокачественной катаральной горячки крупному рогатому скоту передается аэрогенным путем, с кормом и водой [4, 5, 10, 12]. Больные животные выделяют вирус чаще всего в клеточно-связанной форме. Известно, что возбудитель ЗКГ передается от овцы крупному рогатому скоту. Заражение герпесвирусом животных происходит через нос, а затем возбудитель распространяется по организму, в том числе и в легкие, где и размножается в эпителиальных клетках и лимфоцитах. В стадии виремии герпесвирус циркулирует с током крови. При контакте инфицированных герпесвирусом лимфоцитов с клетками-мишениями в носовой полости происходит репликация вируса и выделение вируса с носовыми выделениями, с последующим распространением во внешней среде с выдыхаемым воздухом. Герпесвирус овец 2 типа был обнаружен в респираторном, пищеварительном и мочеполовом трактах [38, 51, 52].

После заражения крупного рогатого скота вирус размножается в лимфоидной ткани лимфатических узлов, пейкеровых бляшек и в центрах размножения лимфоцитов в селезенке. В начальный период болезни малые лимфоциты разрушаются и исчезают из лимфоузлов, селезенки и пейкеровых бляшек, а макрофаги фагоцитируют остатки клеток. В результате этого лимфоидная ткань всего организма стимулируется и вырабатывает лимфоциты среднего размера. Недифференцированные клетки скапливаются вокруг мелких сосудов, в основном венул. Эти везикулярные изменения приводят к нарушению питания окружающих клеток. Все это ведет к образованию множественных эрозий в ротовой полости и дру-

гих органах пищеварительного тракта. В цитоплазме эпителия носовой полости, глотки, конъюнктивы и других органов образуются вирусные тельца-включения.

**Клинические признаки.** Клинические признаки злокачественной катаральной горячки сильно различаются и варьируют от скоротечных до хронических, с наиболее выраженными клиническими симптомами, развивающимися в более затяжных случаях [18]. Инкубационный период у экспериментально зараженных вирусом ЗКГ телят колебался от 15 до 49 дней. Через 4–5 суток после начала заболевания зараженные животные погибали [2, 3]. Иногда регистрируются случаи сверхострого (12–24 часа) течения со смертельным исходом. При этой форме болезни клинические признаки не обнаруживаются, либо развивается депрессия, сопровождающаяся атонией преджелудков, а затем диареей. Острые случаи ЗКГ, вызванные AIHV-1 и OvHV-2, клинически и патологически схожи. В редких случаях регистрируется хроническая форма болезни.

Больной крупный рогатый скот находится в глубокой депрессии с высокой температурой (40,5–42,0°C).



Рис. 1. Большой ЗКГ КРС, находящийся в угнетенном состоянии, отмечается обильная саливация и носовые выделения

У животных наблюдается полная потеря аппетита, помутнение роговицы, которое приводит к слепоте. Больной крупный рогатый скот избегает яркого света, а внезапное воздействие солнечного света вызывает закрытие век. Периферическое (центростремительное) помутнение роговицы — важный клинический признак, указывающий на ЗКГ у крупного рогатого скота.



Рис. 2. Больной ЗКГ КРС, отмечается обильная саливация и помутнение роговицы



Рис. 3. Помутнение роговицы у больного ЗКГ КРС

У дойных коров прекращается молокоотдача. У больных животных отмечается обильное слюнотечение, общая слабость, мышечная дрожь, пугливость, настороженность, коматозное состояние, сильная жажда при отказе от корма и отсутствие жвачки. Характерной особенностью пенистого истечения из

490

ротовой полости является высокая стабильность пены, что позволяет обслуживающему персоналу быстро выявлять больных животных. Слизистая оболочка ротовой полости набухшая, горячая, темно-красного цвета. На внутренней поверхности десен, губ, твердого неба, и языка образуются крупозно-дифтеритические наложения, после удаления которых обнажаются кровоточащие эрозии.



Рис. 4. Эрозии на носогубном зеркале у больного ЗКГ КРС

Из носовой полости выделяются слизистые, в том числе и с примесью крови и эпителия, истечения гнилостного запаха. Эксудат вытекает из ноздрей вязкими нитями. Слизистая оболочка носа воспалена, темно-красного типа. Носовое зеркало сухое и горячее, появляются эрозии. Заметное увеличение всех лимфатических узлов. Может возникнуть эксудативный дерматит, поражающий внутреннюю поверхность бедра и вымени. Больные животные могут стать очень чувствительными к прикосновениям, особенно вокруг головы, и могут стать очень агрессивными и нападать на сопровождающих. На последних стадиях заболевания могут развиваться судороги. Смерть обычно наступает через 5–10 дней после появления клинических признаков. Смертность у клинических пораженных

животных обычно приближается к 95%. Однако в ограниченных условиях выживаемость крупного рогатого скота может быть выше, хотя выжившие редко могут вернуться к нормальной продуктивности. У заболевших злокачественной катаральной горячкой глубокостельных коров регистрируются abortы.

У крупного рогатого скота увеличение лимфатических узлов и тяжелые поражения глаз (панофтальмит, гипопион, помутнение роговицы) встречаются чаще, а геморрагический энтерит и цистит — реже, чем у оленей и бизонов.

У овец ЗКГ протекает в инаппаратной форме [2, 3, 12]. В нескольких вспышках вирус ЗКГ СрНВ-2 вызывал заболевание у белохвостых оленей и пятнистых оленей. Эти случаи были от подострых до хронических с потерей веса, кожным воспалением и алопецией в качестве основных признаков. Неизвестно, вызывал ли этот штамм вируса болезнь у других видов, кроме оленей.

Заболевания оленей и бизонов часто бывают очень острыми, с внезапной смертью. У оленей, которые выживают в течение нескольких дней, и у бизонов перед смертью обычно развиваются геморрагическая диарея, кровянистая моча и помутнение роговицы. Часто наблюдаются высокая температура ( $41$ — $41,5^{\circ}\text{C}$ ) и депрессия. Другие возможные признаки включают катаральное воспаление; эрозии и слизисто-гнойный экссудат, поражающий слизистую оболочку верхних дыхательных путей, глаз и полости рта; увеличение лимфатических узлов; хромота; признаки со стороны ЦНС (депрессия, дрожь, гиперактивность, ступор, агрессивность, судороги) [45].

**Патологоанатомические изменения.** Заболевание носит системный характер, поэтому патологические изменения обнаруживают в большинство органов, хотя степень тяжести и частота сильно различаются и отражают степень тяже-

сти клинических признаков [3, 4, 5, 7]. Патологические изменения при ЗКГ не зависят от возбудителя. Основными поражениями являются воспаление и некроз эпителия слизистой оболочки дыхательных путей, пищеварительной системы или мочи; субэпителиальная лимфоидная инфильтрация; генерализованная лимфоидная пролиферация и некроз; широко распространенный васкулит. Язвы на слизистой оболочке и кровотечения являются обычным явлением. Кровоизлияния могут присутствовать во многих паренхиматозных органах, особенно в лимфатических узлах, во всем желудочно-кишечном тракте, а в более острых случаях могут быть связаны с геморрагическим содержимым кишечника. Классическим, но не патогномоничным гистологическим поражением является фибринOIDНЫЙ некроз мелких мышечных артерий, но могут быть воспалены сосуды всех типов, включая сосуды головного мозга [6]. Могут быть очевидны заметные белые узелки, представляющие интрамуральную и периваскулярную пролиферацию, особенно в почках. Степень поражения лимфатических узлов варьирует у каждого животного. В дыхательных путях часто наблюдаются катаральные скопления, эрозии и образование дифтеритной пленки. В мочевом тракте часто присутствуют характерные эхимотические кровоизлияния эпителиальной оболочки мочевого пузыря, особенно у бизонов. Гистологические изменения послужили основанием для подтверждения случаев поражения ЗКЛ и характеризуются эпителиальной дегенерацией, васкулитом, гиперплазией и некрозом лимфоидных органов, а также распространенными междуузельными скоплениями лимфоцитов в нелимфоидных органах. Васкулит, как правило, присутствует и может быть обнаружен в венах, артериях, артериолах и венулах мозга.

Он характеризуется инфильтрацией лимфоцитами адвенциальной оболочки и средой, часто ассоциированной с фибринOIDной дегенерацией. В мозге также может наблюдаться негнойный менингоэнцефалит с лимфоцитарной периваскулярной инфильтрацией и заметным увеличением количества клеток спинномозговой жидкости. Гиперплазия лимфатических узлов характеризуется расширением лимфобластоидных клеток в паракортексе, тогда как дегенеративные поражения обычно связаны с фолликулами. Пространственное накопление лимфоидных клеток в нелимфоидных органах, в частности в почечной коре и перипортальных областях печени, является типичным, а в случае почки может быть очень обширным с развитием множественных увеличенных белых очагов диаметром 1–5 мм [6, 7].

**Диагностика.** Клинические признаки формы ЗКГ схожи с клиническими признаками других болезней, вызывающих поражения ротовой полости [18, 41]. Таким образом, при подозрении на ЗКГ в ходе лабораторной диагностики необходимо исключить ВД КРС, ящур, катаральную лихорадку и везикулярный стоматит [9, 10, 21, 23]. Окончательный диагноз ЗКГ подтверждается обнаружением ДНК вируса ЗКГ с помощью ПЦР, обнаружением в крови или тканях антител с помощью ИФА и результатами гистопатологических исследований, указывающих на ЗКГ.

Подтверждение инфицирования путем выделения вируса на сегодняшний день может быть выполнено только в отношении AlHV-1.

Характерной особенностью ЗКГ является отсутствие детектируемого вирусного антигена, а попытки выделить вирус, вызывающий болезнь, у животных с клиническими проявлениями ЗКГ, вызванной OvHV-2, заканчиваются неудачно [44].

Вирус AlHV-1 может быть выделен из лейкоцитов периферической крови антилоп гну либо из клеточных суспензий других органов. В большинстве монослоистых культур, полученных от жвачных животных, вирус AlHV-1 обладает цитопатическим действием (ЦПД). Первичные изоляты обычно продуцируют многоядерное ЦПД, в котором вирусный антиген может быть идентифицирован с помощью иммунофлуоресценции или иммуноцитохимии с использованием подходящих антисывороток или моноклональных антител. Возбудитель OvHV-2 никогда не выделялся в культуре клеток, поэтому выявление ДНК возбудителя как AlHV-1, так и OvHV-2 является основным методом диагностики обеих форм заболевания.

У КРС антитела выявляются с помощью ELISA, непрямой иммунофлуоресценции или вестерн-блоттинга, реакция нейтрализации не применяется по причине отсутствия вируснейтрализующих антител [41]. У овец могут обнаруживать антитела в РИФ, ИФА или иммуноблоттинге.

**Профилактика и меры борьбы.** Вакцины против ЗКГ не разработаны. В настоящее время борьба с болезнью основана на раздельном содержании мелкого и крупного рогатого скота.

## Литература

1. Временная инструкция о мероприятиях по борьбе со злокачественной катаральной горячкой крупного рогатого скота. Утв. Минсельхозом СССР. 29.04.1958.
2. Дженсен Р., Маккей Д. Болезни крупного рогатого скота при промышленном откорме. М.: Колос, 1977; 22–28.
3. Закутский Н.И., Хухоров И.Ю., Жестерев В.И. и др. Злокачественная катаральная лихорадка. Герпесвирус-

- ные болезни животных. Владимир. Покров: Фолиант, 2003; 88–96.
4. Шевченко А.А., Черных О.Ю., Шевченко Л.В. и др. Злокачественная катаральная горячка. Инфекционные болезни крупного и мелкого рогатого скота. Краснодар. КубГАУ. 2013; 211–220.
  5. Злокачественная катаральная лихорадка. Инфекционная патология животных. Под ред. А.Я. Самуilenко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. М.: Академкнига, 2006; 1: 687–691.
  6. Злокачественная катаральная лихорадка. Патологоанатомическая диагностика болезней рогатого скота. Под ред. В.П. Шишкова и др. М.: Агропромиздат, 1987; 153–158.
  7. Злокачественная катаральная лихорадка. Патологоанатомическая диагностика вирусных болезней животных: Справочное издание. Под ред. Н.И. Архипова. М.: Колос, 1984; 64–66.
  8. Львов Д.К., Щелканов М.Ю. Герпесвирусы Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д.К. Львова. М.: Медицинское информационное агентство, 2013; 132–144.
  9. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Джайлиди Г.А. и др. Ошибки при клинической диагностике ящура у крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани. 2014; 1: 22–23.
  10. Мищенко А.В., Фомина С.Н., Мищенко В.А. Злокачественная катаральная горячка крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани. 2015; 1: 9–11.
  11. Муруева Г.Б. Эпизоотические и клинические особенности злокачественной катаральной горячки КРС при экстенсивном ведении животноводства. Вестник Бурятской ГСХА им. В.Р. Филиппова. 2013; 3: 24–29.
  12. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Злокачественная катаральная горячка крупного рогатого скота. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика, 2007; 307–309.
  13. Штрауб О.Х. Инфекция крупного рогатого скота, вызванная вирусами герпеса. М.: Колос, 1981; 207.
  14. Юров К.П., Шуляк А.Ф. Герпесвирусы — возбудители массовых заболеваний КРС. Ветеринария. 1998; 11; 10–12.
  15. Barnard B.J.H., Bengis R.G., Griessel M.D., deVos V. Excretion of alcelaphineherpesvirus-1 by captive and free-living wildebeest (*Connochaetes taurinus*) Onderstepoort. J. Vet. Res. 1989; 56: 131–134.
  16. Baxter S.I.F., Wiyono A., Pow I., Reid H.W. Identification of ovine herpesvirus-2 infection in sheep. Arch. Virol. 1997; 142: 823–831.
  17. Berezowski J.A., Appleyard G.D., Crawford T.B., Haigh J., Li H., Middleton D.M., O'Connor B.P., West K., Woodbury M. An outbreak of sheep-associated malignant catarrhal fever in bison (*Bison bison*) after exposure to sheep at a public auction sale. J. Vet. Diagn. Invest. 2005; 17: 55–58.
  18. Bexida R., Guyot H., Saegerman C. et al. Clinical differentiation of malignant catarrhal fever, mucosal disease and bluetongue. Vet. Rec. 2007; 161: 858–859.
  19. Crawford T.B., Li H., Rosenberg S.R., Norhausen R.W., Garner M.M. Mural folliculitis and alopecia caused by infection with goat-associated malignant catarrhal fever virus in two sika deer. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001; 221: 843–847.
  20. Crawford T.B., O'Toole D.T., Li H. Malignant catarrhal fever. In Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice. 4th ed. USA. 1999; 306–309.
  21. Davison A. Herpesvirus systematics. Vet. Microbiol. 2010; 143(1): 52–69.
  22. Gailbreath K.L., O'Toole D., Taus N.S., Knowles D.P., Oaks J.L., Li H. Experimental nebulization of American bison (*Bison bison*) with low doses of ovine herpesvirus 2 from sheep nasal secretions. Vet. Microbiol. 2010; 143: 389–393.

23. Holliman A. Differential diagnosis of diseases causing oral lesions in cattle. In Practice. 2005; 27: 2–13.
24. Kleiboeker S.B., Miller M.A., Schommer S.K., Ramos-Vara J.A., Boucher M., Turnquist S.E. Detection and multi-genic characterization of a herpesvirus associated with malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Missouri. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 1311–1318.
25. Klieforth R., Maalouf G., Stalis I., Terio K., Janssen D., Schrenzel M. Malignant catarrhal fever-like disease in Barbary red deer (*Cervus elaphus barbarus*) naturally infected with a virus resembling alcelaphine herpesvirus 2. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 3381–3390.
26. Li H., Brooking A., Cunha C.W., Highland M.A., O'Toole D., Knowles D.P., Taus N.S. Experimental induction of malignant catarrhal fever in pigs with ovine herpesvirus 2 by intranasal nebulization. Vet. Microbiol. 2012; 159: 485–489.
27. Li H., Dyer N., Keller J., Crawford T.B. Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 1313–1318.
28. Li H., Gailbreath K., Bender L.C., West K., Keller J., Crawford T.B. Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in muskox (*Ovibos moschatus*), Nubian ibex (*Capra nubiana*), and gemsbok (*Oryx gazella*). J. Wildl. Dis. 2003; 39: 875–880.
29. Li H., Gailbreath K., Flach E.J., Taus N.S., et al. A novel subgroup of rhabdoviruses in ruminants. J. Gen. Virol. 2005; 86: 3021–3026.
30. Li H., Keller J., Knowles D.P., Crawford T.B. Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats. J. Gen. Virol. 2001; 82: 227–232.
31. Li H., Keller J., Knowles D.P., Taus N.S., Oaks J.L., Crawford T.B. Transmission of caprine herpesvirus 2 in domestic goats. Vet. Microbiol. 2005; 107: 23–29.
32. Li H., O'Toole D., Kim O., Oaks J.L., Crawford T.B. Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. J. Vet. Diagn. Invest. 2005; 17(2): 171–175.
33. Li H., Shen D.T., Jessup D.A., Knowles D.P., Gorham J.R., Thorne T., O'Toole D., Crawford T.B. Prevalence of antibody to malignant catarrhal fever virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition ELISA. J. Wildl. Dis. 1996; 32: 437–443.
34. Li H., Snowder G., Crawford T.B. Production of malignant catarrhal fever virus-free sheep. Vet. Microbiol. 1999; 65: 167–172.
35. Li H., Snowder G., O'Toole D.T., Crawford T.B. Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 223–226.
36. Li H., Snowder G., O'Toole D.T., Crawford T.B. Transmission of ovine herpesvirus 2 among adult sheep. Vet. Microbiol. 2000; 71: 27–35.
37. Li H., Taus N.S., Jones C., Murphy B., Evermann J.F., Crawford T.B. A devastating outbreak of malignant catarrhal fever in a bison feedlot. J. Vet. Diagn. Invest. 2006; 18: 119–123.
38. Li H., Taus N.S., Lewis G.S., Kim O., Traul D.L., Crawford T.B. Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 5558–5564.
39. Li H., Wunschmann A., Keller J., Hall D.G., Crawford T.B. Caprine herpesvirus-2 associated malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J. Vet. Diagn. Invest. 2002; 15: 46–49.
40. Loken T., Aleksandersen M., Reid H., Pow I. Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. Vet. Rec. 1998; 143: 464–467.

41. Malignant catarrhal fever. OIE Terrestrial Manual. 2018; Chapter 3. 4. 13. 1172–1184.
42. Mushi E.Z., Rossiter P.B., Jessett D., Karstad L. Isolation and characterization of a herpesvirus from topi (*Damaliscus korrigum*, Ogilby). *J. Comp. Pathol.* 1981; 91: 63–68.
43. Mushi E.Z., Rurangirwa F.R., Karstad L. Shedding of malignant catarrhal fever virus by wildebeest calves. *Vet. Microbiol.* 1981; 6: 281–286.
44. O'Toole D., Li H. The pathology of malignant catarrhal fever an emphasis on ovine herpesvirus 2. *Vet. Pathology.* 2014; 51: 437–452.
45. O'Toole D., Taus N., Montgomery D. et al. Inter-nasal inoculation of American Bison (*Bison bison*) ovine herpesvirus-2 (OVHV-2) reliably reproduces malignant catarrhal fever. *Vet. Pathology.* 2007; 44(5): 655–662.
46. Okeson D.M., Garner M.M., Taus N.S., Li H., Coke R. Ibex-associated malignant catarrhal fever in a bongo antelope (*Tragelaphus euryceros*). *J. Zoo Wild. Med.* 2007; 38: 460–464.
47. Plowright W. Malignant Catarrhal Fever in East Africa. *Res. Vet. Sci.* 1965; 6: 57–83.
48. Plowright W. Malignant catarrhal fever. *Rev. Sci. Tech. Oie.* 1986; 5: 897–958.
49. Powers J.G., VanMetre D.C., Collins J.K., Dinsmore R.P., Carman J., Patterson G., Brahmbhatt D., Callan R.J. Evaluation of ovine herpesvirus type 2 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005; 227: 606–611.
50. Russell G., Stewart J., Haig D. Malignant catarrhal fever: a review. *Vet. J.* 2009; 3: 324–335.
51. Taus N., Traul D., Oaks J. et al. Experimental infection of sheep with ovine herpesvirus 2 via aerosolization of nasal secretions. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 575–579.
52. Taus N.S., Oaks J.L., Gailbreath K., Traul D.L., O'Toole D., Li H. Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. *Vet. Microbiol.* 2006; 116: 29–36.

# VIII. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

## СИБИРСКАЯ ЯЗВА

Шабейкин А.А.

**Сибирская язва (*Anthrax*)** — природно-очаговое зооантропонозное заболевание, вызываемое спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*.

**Этиология.** Вегетативная клетка *B. anthracis* представляет собой грамположительную неподвижную палочковидную бактерию шириной 1,0–1,5 мкм и длиной 6–10 мкм. Вегетативные формы *B. anthracis* способны размножаться практически во всех тканях инфицированного макроорганизма и детерминируют развитие патологических процессов в организме биологического хозяина [1, 2]. При попадании в неблагоприятные условия *B. anthracis* образует одну центрально расположенную эндоспору, размер которой не превышает ширины тела микробной палочки. Споровая форма позволяет бактериям сохранять генетический материал в течение длительного времени [3, 4]. Одновременно споровая форма необходима *B. anthracis* для успешного инфицирования животных путем попадания и прорастания внутри макрофагов [5, 6].

По таксономической классификации Объединённой таксономической информационной службы (ITIS; № 959822), молекулярной систематике Национального центра биотехнологической информации (NCBI; № txid1392) вид *Bacillus anthracis* входит в род *Bacillus*, семейство *Bacillaceae*, порядок *Bacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*. Внутри рода *Bacillus* выделяют группу *Bacillus cereus*, объединяющую виды с близкородственной филогенией, высоким уровнем сходства морфологии,

физиологии клеток и механизмов обмена генетическим материалом [7, 8, 9]. К группе *Bacillus cereus* относят *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. cytotoxicus*, которые, согласно филогенетическим исследованиям, образуют 5 основных клад [10]. Клада, которая объединяет *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, имеет относительно близкое общее предковое происхождение от бактерий, похожих на современные варианты убиквитарной почвенной бактерии *B. cereus*. Все три вида, входящие в кладу, характеризуются наличием патогенного потенциала, который детерминирован плазмидами, несущими гены вирулентности. Плазмиды вирулентности бацилл не обладают способностью к саморепликации, но могут распространяться как внутри популяций одного вида бактерий, так и между близкородственными видами путем передачи через коньюгативные плазмиды или через трансдуцирующие фаги [11, 12, 13].

Среди всех представителей рода *Bacillus* *B. anthracis* является единственным облигатным патогенным микроборганизмом, который способен в естественных условиях вызывать развитие системной летальной инфекции у большого числа видов млекопитающих животных [14, 9].

Патогенные свойства *B. anthracis* обеспечиваются наличием у бактерии двух плазмид *pXO1* и *pXO2*. Полная или частичная потеря плазмид ведет к из-

менению фенотипических признаков *B. anthracis* как патогенного вида и возникновению авирulentных штаммов [15, 16].

Плазмида *B. anthracis pXO1* состоит из 182 тысяч пар нуклеотидов (п.н.) и несет в своем составе «остров патогенности» — участок размером 44,8 тысяч п.н. (*PAI*), на котором расположены гены, обеспечивающие выработку белков летального и отечного токсинов, регуляторные гены: активатор (*AtxA*) и репрессор транскрипции (*PagR*), три гена оперона прорастания спор и ген адгезина S-слоя бактерии (*BsLA*). Токсины сибирской язвы образуются при парных комбинациях трех белков, не являющихся токсичными по отдельности: протективного антигена (*PA*, 83 kDa), летального фактора (*LF*, 90 kDa) и фактора отека (*EF*, 89 kDa). Комбинация *PA* и *LF* образует летальный токсин сибирской язвы, комплекс *PA* с *EF* приводит к формированию токсина отека. Плазмида *pXO2* состоит из 96 тысяч п.н., содержит пять генов оперона капсулы *B. anthracis* (*capBCADE*). Наличие капсулы из полигамма-D-глутаминовой кислоты позволяет *B. anthracis* избегать фагоцитоза клетками иммунной системы [17, 18, 19, 20].

Обладание плазмидами *pXO1* и *pXO2* и их аналогами не является уникальной способностью *B. anthracis*. Штаммы *B. cereus*, содержащие одну или обе плазмиды *pBCXO1* и *pBCXO2*, которые подобны *pXO1* и *pXO2*, относят к *Bacillus cereus biovar anthracis* [21]. Изоляты *Bacillus cereus biovar anthracis* выделялись от различных видов млекопитающих животных в Западной и Центральной Африке при выявлении заболеваний, клинически похожих на сибирскую язву [22, 23, 24, 25]. Регистрируемые отличия по бактериологическим свойствам и молекулярным характеристикам между различными

штаммами *Bacillus cereus biovar anthracis* указывают на дискретность группы и дают основания полагать, что в условиях высокого биоразнообразия Африка являлась исходной зоной первичного появления *B. anthracis* [21, 26].

К видовым генетическим отличиям *B. anthracis* относят наличие четырех профагов и ряда мутаций в хромосомной ДНК. Нонсенсная хромосомная мутация переключила в дефектное состояние ген плейотропного регулятора *PlcR*, который регулирует целый набор генов, функционально активных у других представителей группы *Bacillus cereus* [27, 20, 21]. Ген *PlcR* ответственен за индукцию целого ряда ферментов и токсинов, включая коллагеназы, гемолизины, фосфолипазы и энтеротоксины, и его отключение обеспечило целый ряд фенотипических отличий *B. anthracis* от *B. thuringiensis* и других видов группы *Bacillus cereus*. Считается, что возникновение и эволюционное закрепление данной мутации было обусловлено несовместимым конкурирующим взаимодействием *PlcR* с основным регулятором вирулентности *AtxA*, входящего в состав плазмида *pXO1* *B. anthracis* [28, 29]. Другие важные мутации в геноме *B. anthracis* были обнаружены в генах *fliC*, *hom2*, *asd1*, *metX*, *metH*. Мутация в гене *fliC* привела к прекращению синтеза флагеллина, важного элемента в строении жгутиков бактерий, что послужило причиной потери подвижности [30]. Мутация в гене *hom2* вызвала нарушение синтеза гомосериндегидрогеназы, фермента участующего в биосинтезе L-аспартата, и превратила *B. anthracis* в ауксотроф по метионину, цистеину и треонину. Изменения метаболических процессов позволили *B. anthracis* увеличить скорость биосинтеза лизина, который входит в состав пептидогликанов клеточной стенки бактерий [31, 32]. Совокупное приобретение двух плазмид

вирулентности и целого ряда хромосомных мутаций, изменивших метаболизм бактерии, обеспечили эмерджентный переход предкового вида *B. anthracis* к облигатной патогенности. Сформировавшаяся и эволюционно закрепившаяся патологическая парадигма является характерной особенностью *B. anthracis*, которая отличает ее от других представителей рода *Bacillus* [33].

**Патогенез и клинические признаки.** Наиболее чувствительные к инфицированию и являющиеся основными биологическими хозяевами *B. anthracis* в естественных условиях — жвачные животные. Считается, что основной механизм передачи возбудителя, регистрируемый у жвачных животных, алиментарный. Заражение животных происходит преимущественно при попадании спор *B. anthracis* в желудочно-кишечный тракт в период выпаса [34]. Аэрогенный механизм передачи в результате попадания спор *B. anthracis* на слизистую дыхательных путей животных происходит при вдыхании аэрозолей, которые могут формироваться при пастьбе и перегоне [35]. Трансмиссивный механизм передачи возможен, но реализуется только при высокой плотности популяций насекомых гематофагов [36]. Влияние этого механизма на развитие эпизоотического процесса среди крупного рогатого скота имеет локальный, ограниченный характер из-за пространственной привязки к зоне с холодным климатом и коротким летом. Контактный механизм передачи не является значимым при распространении возбудителя сибирской язвы среди крупного рогатого скота, но выступает доминирующим при распространении заболевания среди людей, особенно тех, которые заняты при разделке туш вынужденно убитого скота, ухаживают за больными животными, непосредственно контактируют с животноводческим сырьем [37].

Характер и тяжесть развития патологических процессов связаны с действиями летального и отечного токсинов, продуцируемых интенсивно размножающимися вегетативными клетками *B. anthracis*, число которых к моменту гибели животного может составлять  $1 \times 10^9$  в 1 мл крови [38].

Развивающиеся патологические процессы характеризуются септицемией, острой интоксикацией, геморрагической инфильтрацией подкожной и соединительной тканей, поражением кожи, кишечника, легких, печени, почек, селезенки, лимфатических узлов. В большинстве случаев болезнь заканчивается летальным исходом. Различают септическую и карбункулезную (кожную) формы болезни, которые развиваются под действием различных механизмов заражения животных. Кожная форма самостоятельно, без развития септического процесса, у крупного рогатого скота практически не встречается [38]. Молниеносное течение болезни характеризуется внезапным развитием судорог и быстрой гибелью животного. При остром и подостром течении болезни регистрируют повышение температуры тела до  $41\text{--}42,5^\circ\text{C}$ , трепет, апатию, тахикардию, тахипноэ. У животных развивается жажда, отказ от корма, цианоз, тимпания, диарея с кровянистыми каловыми массами, из ротовой полости и носа отмечается выделение пенистой жидкости с примесью крови, возможна гематурия. На теле в области подгрудка, шеи, живота образуются горячие припухлости и отеки. Гибель животного при остром течении наступает на 2–3-й день. При подостром течении болезнь характеризуется аналогичными клиническими признаками, но длится до 5–8 дней. Хроническое течение болезни, которое длится 2–3 месяца, и abortивное течение с выздоровлением животного у крупного рогатого скота регистрируются крайне редко. Хроническое течение

болезни характеризуется прогрессирующим исхуданием больного животного, формированием инфильтратов и увеличением лимфатических узлов. При абортивном течении отмечают только повышение температуры.

В период агонии у животного отмечается выделение из естественных отверстий кровянистой пенистой жидкости. Трупное окоченение при сибирской язве, как правило, не выражено, кровь не сворачивается, густая, темно-вишневого цвета.

**Эпизоотология.** До середины XX века сибирская язва входила в список наиболее распространенных и опасных инфекционных болезней животных в России [39]. Всего за XX век на территории Российской Федерации болезнь была зарегистрирована более чем в 35000 пунктах [40]. После внедрения и начала массового применения бескап-

сульных вакцин (СТИ-1, разработана Гинзбургом Н.Н. в 1940 г.; ГНКИ, разработана Колесовым С.Г. и соавторами в 1955 г.), введения Ветеринарных инструкций от 28 февраля 1953 года и от 5 июля 1981 года, регламентирующих ветеринарно-санитарные мероприятия при возникновении вспышек сибирской язвы и предписывающих обязательно сжигать трупы погибших животных, интенсивность эпизоотии стала уменьшаться [16]. К началу XXI века частота вспышек сибирской язвы снизилась до спорадического уровня [41].

Согласно запросу на выборку в «Базе данных стационарно неблагополучных пунктов и случаев заболеваемости животных сибирской язвой в Российской Федерации», в Российской Федерации после 2000 года более 65% от общего числа вспышек сибирской язвы были

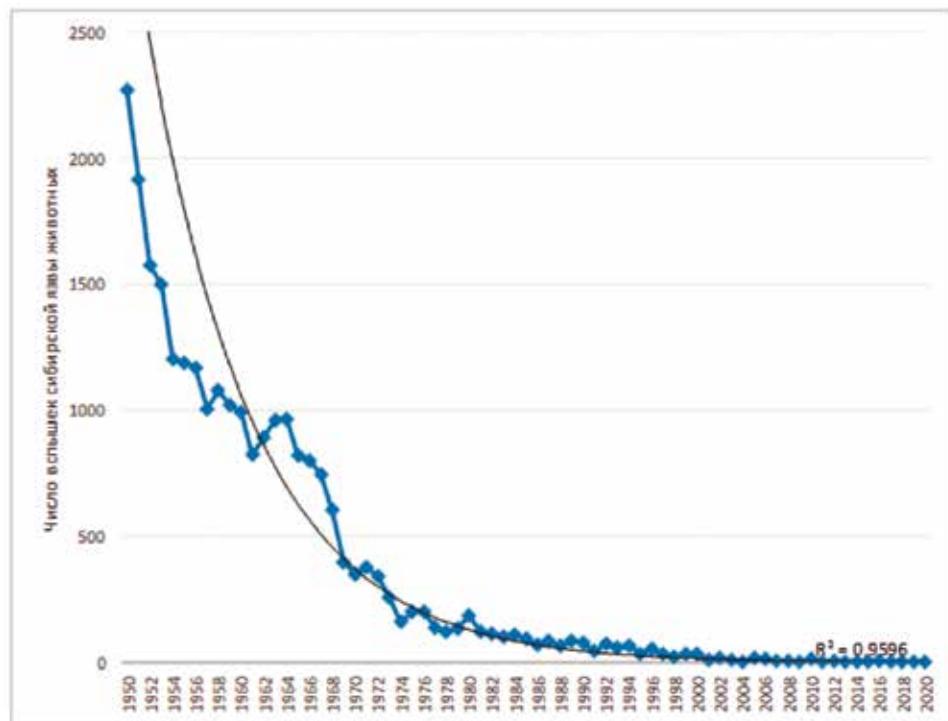


Рис. 1. Динамика регистрации и экспонентная линия тренда числа вспышек сибирской язвы животных на территории Российской Федерации за период с 1950 по 2020 гг.

связаны со случаями заболевания крупного рогатого скота [42].

Географические и временные особенности эпизоотического процесса при сибириезвенной инфекции обусловлены различиями в биологических сценариях, которые проходит *B. anthracis* при чередующихся абиотических и биотических циклах [43].

После гибели инфицированных животных и в случае разрушения кожных покровов трупа вегетативные клетки *B. anthracis* образуют споры при условиях доступа воздуха и температуре окружающей среды +12 до +43°C [44]. При отсутствии доступа кислорода к тканям трупа происходит гибель вегетативных клеток *B. anthracis* в течение 7 суток при температуре +20°C и через 11 суток при температуре +2°C [45]. При переходе в споровую форму *B. anthracis* не погибает в разлагающемся материале, при засушке и солке мяса и шкур. Споры *B. anthracis* погибают только после 15–30-минутного кипчечения, под действием сухого жара при температуре 120–140°C — через 2–4 часа, при автоклавировании при температуре 110°C — через 40 минут, под действием 4% раствора формалина инактивация спор происходит через 2 часа.

Споры *B. anthracis* после контаминации объектов внешней среды могут сохраняться механически в абиотическом состоянии, могут прорастать и погибнуть или сформировать устойчивые почвенные колонии. Исторически в условиях отсутствия современных ветеринарно-санитарных мероприятий эпизоотический процесс поддерживался за счет регулярной смены биотического-абиотического цикла благодаря периодическому инфицированию новых животных. Вакцинация сельскохозяйственных животных, дезинфекционные мероприятия и сжигание трупов погибших животных позволили разорвать естественный процесс инфекционной передачи возбуди-

теля, что привело к изменению характера эпизоотического процесса, когда новые вспышки формируются в результате манифестиации почвенных очагов сибирской язвы после длительного латентного периода. Современный спорадический уровень числа вспышек сибирской язвы связан с ауксотрофией *B. anthracis* и плохой выживаемостью в почве [46].

Сложность получения роста колоний *B. anthracis* в средах, моделирующих почву, сформировали распространенное научное заключение о превалировании «механической» роли почвы в эпизоотическом процессе сибирской язвы [37, 47, 48, 49, 50, 51]. Однако приуроченность нозоареала сибирской язвы к определенным типам почв не может быть объяснена различиями в сохранности спор, которые являются высокоустойчивыми формами к любым агрессивным физико-химическим условиям окружающей среды. Этот феномен указывает на возможность и наличие периодических циклов вегетации бактерии [52, 53, 38, 54]. В то же время *B. anthracis* является в высокой степени генетически и фенотипически мономорфным видом, что указывает на относительно редкое прохождение бактерией лабильной биотической стадии с формированием вегетативных форм [55, 56, 57]. Считается, что наиболее вероятным биологическим сценарием, обеспечивающим сохранение *B. anthracis* в слоях только определенной почвы, является встраивание колоний бактерии в состав локальных «благоприятных» почвенных биосистем [33]. Гипотеза, предложенная Van Ness, основывается на предположении, что в почвах, богатых органическими веществами, кальцием и с pH выше 6,0, формируются «зоны инкубации», где происходит многократная вегетация и накопление микробных клеток *B. anthracis* [58].

В резко неблагоприятных физико-химических условиях, например в услови-

ях вечной мерзлоты, споры *B. anthracis* могут не проходить стадию почвенной вегетации, оставаясь в неизменном виде неограниченное количество времени [59, 57].

При попадании спор *B. anthracis* в слои экологически неподходящей почвы в теплое время года после температурно-влажностной провокации происходит их периодическое прорастание с последующей гибелюю части колоний и (или) началом процессов диссоциации колоний с образованием слабовирулентных или авирулентных вариантов [3, 38, 60, 61]. Потеря *B. anthracis* плазмиды *pXO2* или формирование мутационных изменений с прекращением экспрессии капсулы, наблюдаемые при длительном нахождении бактерии в почве, обеспечивают адаптацию бактерии к новым экологическим условиям [62, 63]. Процесс элиминации *B. anthracis* из почв с недружественным биоценозом находит-

ся в зависимости от почвенно-климатических характеристик природной зоны и может занимать от нескольких лет до нескольких десятков лет [46].

Вероятность попадания *B. anthracis* в благоприятные условия в почве крайне низкая, но в случае положительной реализации позволяет сформировать устойчивые почвенные колонии, сохранившиеся десятки лет [64]. Механизм формирования почвенных «зон инкубации» пока находится в стадии изучения. К вероятным сценариям относят возможность встраивания колоний *B. anthracis* в существующие биопленки других почвенных микроорганизмов, колонизацию кишечника почвенных червей, размножение в организмах простейших геобионтов, например в амебе *Acanthamoeba castellanii* [65, 66, 67].

Возможность длительного сохранения почвенных очагов *B. anthracis* в почвах только с определенными характеристи-

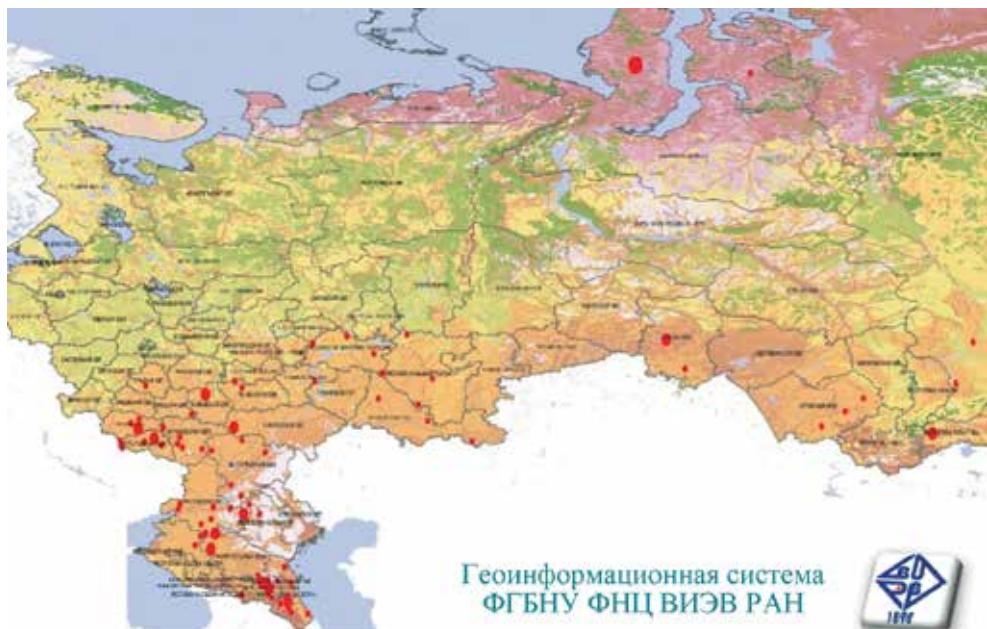


Рис. 2. Пространственное распределение вспышек сибирской язвы, зарегистрированных в Российской Федерации после 2003 г. Наложение на почвенную карту в тематической геоинформационной системе

ками обуславливает особенности географического расположения нозоареала сибирской язвы в последние десятилетия. Зона современного неблагополучия по сибирской язве в Российской Федерации обладает пространственной приуроченностью к южным регионам страны, преимущественно затрагивая территорию четырёх природно-сельскохозяйственных провинций: сухостепной, степной, лесостепной и Кавказско-Крымской горной области [68].

Основным направлением противоэпизоотических мероприятий против сибирской язвы в Российской Федерации остается массовая профилактическая вакцинация наиболее восприимчивых животных: крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота и лошадей. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано нескольких вариантов вакцин для сельскохозяйственных животных. Вакцины для животных изготавливаются из спор живой бескапсульной культуры *Bacillus anthracis* аттенуированного вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ. Для профилактической иммунизации людей, входящих в группу профессионального риска, используется вакцина СТИ.

При выявлении случаев заболеваний животных сибирской язвой устанавливают ограничительные мероприятия (карантин) в соответствии с установленными Ветеринарными правилами. В эпизоотическом очаге все животные с клиническими признаками болезни или повышенной температурой тела подвергаются лечению. Используется противосибиреязвенный глобулин, противосибиреязвенная сыворотка и антибиотики. Через 14 дней после выздоровления животных осуществляется их вакцинация против сибирской язвы. Среди клинически здоровых животных, находящихся в эпизоотическом очаге, проводится вакцинация против сибирской язвы вак-

циной против сибирской язвы согласно инструкции по применению. При выявлении у вакцинированных животных клинических признаков сибирской язвы осуществляется их лечение. Отмена карантина осуществляется через 15 дней после падежа или выздоровления последнего больного животного в эпизоотическом очаге [69].

**Диагностика сибирской язвы.** Диагноз сибирская язва ставится на основании клинических признаков болезни у животных, эпизоотологических данных и положительных результатов лабораторных исследований. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы проводится в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды» (утверждены 01.09.86 начальником Главного управления ветеринарии Госагропромкомитета СССР и начальником Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР), а также МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» (утверждены 29 июля 2008 г. руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека). Классическая схема лабораторной диагностики сибирской язвы включает световую микроскопию мазков (на основании которой немедленно дают предварительный ответ), посев на питательные среды, постановку биологической пробы. Бактериологическое исследование материала основывается на оценке морфологии колоний, отсутствии подвижности микробных клеток, определении чувствительности к пенициллину и диагностическим бактериофагам, способности к образо-

ванию капсулы на дифференциальном диагностических средах, отсутствии гемолиза на агаре с дефибринированной кровью барана и определении полного отсутствия или слабовыраженности выработки бактериальными колониями фосфатазы.

Из дополнительных методов лабораторных исследований для обнаружения возбудителя сибирской язвы широко используют люминесцентную микроскопию — МФА и постановку ПЦР.

Для обнаружения сибирического антигена в экстрактах из шкур и органов павших животных применяется реакция преципитации по Асколи.

Загнивший патологический материал исследуется с помощью реакции преципитации и ПЦР.

Проблемы с точностью лабораторной диагностики связаны с относительно распространенной вариабельностью в проявлении фенотипических признаков полевых штаммов *B. anthracis* и генетической близостью всех представителей группы *Bacillus cereus*. Однако, учитывая спорадический характер проявления сибирской язвы в последние десятилетия, ложноположительный диагноз из-за заболеваний животных, обусловленных *B. cereus*, не является существенной проблемой. Более серьезный вопрос заключается в оперативности постановки диагноза, особенно на фоне длительных периодов благополучия. Крупная вспышка сибирской язвы в Краснодарском крае в 2010 году, повлекшая гибель 152 голов крупного рогатого скота, и вспышка в Ямало-Ненецком АО в 2016 году с гибелюю 2573 оленей и одного человека указывают на важность своевременной диагностики, отсутствие которой при особо опасном зооантропонозном заболевании провоцирует ежедневно возрастающую по экспоненте тяжесть последствий.

## Литература

1. Turnbull P.C. Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 271: 1–19.
2. Driks A. The *Bacillus Anthracis* Spore. *Mol. Aspects. Med.* 2009; 30(6): 368–373.
3. Рево М.В., Жукова М.Д. Возбудитель сибирской язвы. Ветеринарная микробиология. М.: Сельхозиздат, 1958; 246–251.
4. Преснов И.Н. Дис. ... канд. вет. наук. М., 1966.
5. Hanna P.C., Ireland J.A. Understanding *Bacillus anthracis* pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1999; 7(5): 180–182.
6. Mallozzi M., Bozue J., Giorno R., Moody K., Slack A., Cote C., Qiu D., Wang R., McKenney P., Lai E., Maddock J.R., Friedlander A., Welkos S., Eichenberger P., Driks A. Characterization of a *Bacillus anthracis* spore coat-surface protein that influences coat-surface morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 289: 110–117.
7. Ash C., Collins M.D. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992; 75–80.
8. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* — One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 2627–2630.
9. Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29: 303–329.
10. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus*: *Bacillus* species with pathogenic potential. 2019; 7: 3.
11. Reddy A., Battisti L., Thorne C.B. Identification of self-transmissible plas-

- mids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Bacteriol.* 1987; 169(11): 5263–5270.
12. Koehler T.M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. Molecular Aspects of Medicine. 2009; 30(6): 386–396.
  13. Bartoszewicz M., Marjańska P.S. Milk-originated *Bacillus cereus* sensu lato strains harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids are genetically and phenotypically diverse. *Food Microbiol.* 2017; 67: 23–30.
  14. Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolsto A.B. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 191–201.
  15. Рязанова А.Г. Характеристика биологических свойств атипичных штаммов сибириеязвенного микробы, усовершенствование методов их идентификации и дифференцирования от близкородственных бацилл. Дис. ... канд. биол. наук. Ростов на Дону, 2006.
  16. Куличенко А.Н., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Еременко Е.И. Сибирская язва на Северном Кавказе. Майкоп: Качество, 2016.
  17. Koehler T.M. *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 271: 143–164.
  18. Xu Y., Liang X., Chen Y., Koehler T.M., Höök M. Identification and biochemical characterization of two novel collagen binding MSCRAMMs of *Bacillus anthracis*. *The Journal of biological chemistry.* 2004; 279: 51760–51768.
  19. Candela T., Mock M., Fouet A. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *Bacteriol.* 2005; 187: 7765–7772.
  20. Kolsto A., Tourasse N.J., Okstad O.A. What sets *Bacillus anthracis* apart from other bacillus species? *Annual Review of Microbiology.* 2009; 63: 451–476.
  21. Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., Bruggemann H., Dupke S., Wollherr A., Franz T., Pauli G., Appel B., Liebl W., Couacy-Hymann E., Boesch C. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One.* 2010; 7(5): e10986.
  22. Hoffmaster A.R., Hill K.K., Gee G.E., Marston C.K., De B.K., Popovic T., Sue D., Wilkins P.P., Avashia S.B., Drumgoole R., Helma C.H., Ticknor L.O., Okinaka R.T., Jackson P.J. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *Clin. Microbiol.* 2006; 44(9): 3352–3360.
  23. Wright A.M., Beres S.B., Consamus E.N., Long S.W., Flores A.R., Barrios R., Richter G.S., Oh S., Garufi G., Maier H., Drews A., Stockbauer K.E., Cernoch P., Schneewind O., Olsen R.J., Musser J.M. Rapidly progressive, fatal, inhalation anthrax like infection in a human: case report, pathogen genome sequencing, pathology, and coordinated response. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011; 135(11): 1447–1459.
  24. Brezillon C., Haustant M., Dupke S., Corre J.P., Lander A., Franz T., Monot M., Couture-Tosi E., Jouvion G., Leendertz F.H., Grunow R., Mock M.E., Klee S.R., Goossens P.L. Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar *anthracis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4): e0003455.
  25. Marston C.K., Ibrahim H., Lee P., Churchwell G., Gumke M., Stanek D., Gee J.E., Boyer A.E., Gallegos-Candela M. Anthrax toxin-expressing *Bacillus cereus* isolated from an anthrax-like eschar. *PLoS One.* 2016; 11(6): e0156987.
  26. Antonation K.S., Grützmacher K., Dupke S., Mabon P., Zimmermann F., Lankester F., Tianna P., Feistner A., Todd A., Herbinger I., de Nys H. et al. *Bacillus cereus* biovar *anthracis* causing anthrax in Sub-Saharan Africa — chromosomal

- monophyly and broad geographic distribution. PLoS neglected tropical diseases. 2016; 10(9): e0004923.
27. Agaisse H., Gomlnet M., Økstad O.A., Kolstø A.B., Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. Molecular Microbiology. 1999; 32(5): 1043–1053.
  28. Mignot T., Mock M., Robichon D., Landier A., Lereclus D., Fouet A. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2001; 42: 1189–1198.
  29. Sastalla I., Maltese L.M., Pomerantseva O.M., Pomerantsev A.P., Keane-Myers A., Leppla S.H. Activation of the latent PlcR regulon in *Bacillus anthracis*. Microbiology. 2010; 156(10): 2982–2993.
  30. Микшис Н.И., Каштанова Т.Н., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов *Bacillus anthracis* и филогенетически родственных видов, основанный на выявлении различий в структуре хромосомных генов биосинтеза флагеллина и метионина. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015; 4: 22–26.
  31. Velasco A.M., Leguina J.I., Lazcano A. Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways. Mol. Evol. 2002; 55(4): 445–459.
  32. Микшис Н.И., Живова Ю.Н., Новикова Л.В., Шарапова Н.А., Попов Ю.А., Кутырев В.В. Определение различий в структуре генов биосинтеза метионина у штаммов *Bacillus anthracis* и филогенетически родственных видов бацилл. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012; 2: 21–25.
  33. Макаров В.В., Сухарев О.И. Мировой нозоареал сибирской язвы. Ветеринарная патология. 2012; 39(1): 7–15.
  34. Вышелесский С.Н. Частная эпизootология. М.: Сельхозгиз, 1948.
  35. Мицаев Ш.Ш. Сибирская язва в Чеченской республике. Махачкала: АЛЕФ, 2016.
  36. Swartz M.N. Recognition and management of anthrax — An update. New England Journal of Medicine. 2001; 1621–1626.
  37. Громашевский Л.В. К проблеме ликвидации болезней. Микробиология. 1965; 12: 3–10.
  38. Колесов С.Г. Сибирская язва. М.: Колос, 1976.
  39. Веденников В.А., Бакулов И.А., Гаврилов В.А. Эпизоотическая обстановка по сибирской язве животных в РФ. Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 1996; 2: 68–71.
  40. Черкасский Б.Л., Форстман Д.В., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А., Файзов Т.Х. Опыт использования ГИС-технологий для изучения закономерностей пространственно-временного распределения стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005; 6: 19–23.
  41. Симонова Е.Г., Картаевая С.А., Раич С.Р., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А. Сибирская язва в Российской Федерации: совершенствование эпизоотолого-эпидемиологического надзора на современном этапе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018; 17(2): 57–62.
  42. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Патрикеев В.В., Раич С.Р., Степанова Т.В. База данных стационарно неблагополучных пунктов и случаев заболеваемости животных сибирской язвой в Российской Федерации. М., 2020.
  43. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: Интерсэн, 2002.
  44. Вернер О.М., Волкова В.П., Синяк К.М. Спорообразование у возбудителя сибирской язвы в модельных

- почвенных условиях. Микробиология. 1988; 50(6): 31–36.
45. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Степанов А.В. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999.
46. Шабейкин А.А., Гулюкин М.И. Современные особенности эпизоотологии сибирской язвы на территории Российской Федерации. Ветеринария и кормление. 2013; 3: 15–18.
47. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. М.: Медицина, 1984.
48. Lindeque P.M., Turnbull P.C. Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. Onderstepoort J. Vet. Res. 1994; 61: 71–83.
49. Turnbull P.C. Guidance on environments known to be or suspected of being contaminated with anthrax spores. Land Contamination and Reclamation. 1996; 4: 37–45.
50. Jones M.N., Turnbull P.C. Disinfection against spores of *Bacillus anthracis*. Salisbury Med. Bul. 1996; 87: 12.
51. Гаврилов В.А., Грязнева Т.Н., Селиверстов В.В. Сибирская язва — вечная проблема землян. М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрыбина, 2017.
52. Коронный А.В. Развитие бацилл антракса в почве и процессы их изменчивости. Сб. научн. труд. Эстонской с.-х. академии. Тарту, 1958; 4: 99–105.
53. Шляхов Э.Н., Груз Е.В., Присакарь В.И. Сибирская язва. Кишинев: Штиинце, 1975.
54. Ипатенко Н.Г., Седов В.А., Зелепукин В.С., Гущин В.Н. Сибирская язва сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат, 1987.
55. Harrell L.J., Andersen G.L., Wilson K.H. Genetic variability of *B. anthracis* and related species. Journal of clinical microbiology. 1995; 33(7): 1847–1850.
56. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Hyunh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infection, Genetics and Evolution. 2004; 4(3): 205–213.
57. Попова А.Ю., Куличенко А.Н. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Ижевск: Принт 2, 2017.
58. Van Ness J.B. Ecology of anthrax. Science. 1971; 172: 1303–1307.
59. Черкасский Б.Л. Сибирская язва как биологическое оружие. М., 2002.
60. Сорокин Ю.И., Родзиковский А.В. Экология возбудителей споронозов. Сб. науч. труд. М., 1988; 65–79.
61. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Герасимов В.Н. Сибиреязвенные скотомогильники проблемы и решения. М.: Династия, 2017.
62. Саркисова Н.В. Характеристика штаммов сибиреязвенного микробы, выделенных на территории СНГ, М., 2005.
63. Saile E., Koehler T.M. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72: 3168–3174.
64. Адамович В.А., Белицкая Г.А., Кукареин Н.Ф. Вопросы эффективности противосибиреязвенных мероприятий. Материалы Всесоюз. науч. симпозиума: пленар. заседание междуведомств. науч.-метод. комисс. по борьбе с сибирской язвой. К вопросу оздоровления почвенных очагов сибирской язвы в Брянской области. М., 1974.
65. Lee K., Costerton J.W., Ravel J., Auerbach R.K., Wagner D.M., Keim P., Leid J.G. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. Microbiology. 2007; 153(6): 1693–1701.
66. Шишкова Н.А., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Влияние дождевых червей на находящиеся в почве споры

- сибириеязвенного микробы. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 111: 66–69.
67. Dey R., Hoffman P.S., Glomski I.J. Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78(22): 8075–8081.
68. Симонова Е.Г., Раич С.Р., Картавая С.А., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А. Проявления активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации в современных условиях. Проблемы особо опасных инфекций. 2018; 2: 90–94.
69. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы. Утв. приказом Минсельхоза России от 14 августа 2017 г. № 403.

# БРУЦЕЛЛЕЗ

Скляров О.Д., Климанов А.И., Бабичева О.В.

**Определение болезни.** Бруцеллез (*Brucellosis*) — зоонозная, хронически протекающая болезнь животных разных видов, в том числе морских млекопитающих, а также людей, вызываемая бактериями рода *Brucella*.

Восприимчивость к бруцеллезу зарегистрирована у 60 видов позвоночных. У сельскохозяйственных животных болезнь имеет тенденцию к широкому распространению и проявляется в виде массовых абортов, бесплодия, яловости, снижения жизнеспособности приплода и продуктивности.

Профилактика и ликвидация бруцеллеза требует значительных материальных затрат. Ущерб, причиняемый бруцеллезом, усугубляется заболеванием людей, которое зачастую ведет к потере трудоспособности и инвалидности. В целом бруцеллез наносит существенный социальный и экономический ущерб.

**Этиология.** Считается, что первое описание болезни у людей, соответствующей бруцеллезу по клиническим проявлениям, было сделано Гиппократом (450–370 г. до новой эры). Болезнь наблюдали на острове Тассос (Греция) около 430 г. до н.э.

Дж. А. Марстон (1861) подробно описал самостоятельную болезнь людей на о. Мальта с симптомами лихорадки под названием «средиземноморская ремитирующая или гастрическая ремитирующая лихорадка» (мальтийская лихорадка), которая впоследствии была отнесена к бруцеллезу.

Особое значение в истории изучения болезни имеет 1887 год, в котором английский военный врач Д. Брюс (Bruce) на Мальте выделил из селезенки одного из 4 погибших солдат, больных «маль-

тийской», или «средиземноморской», или «ундулирующей» лихорадкой, возбудителя, названного впоследствии *Micrococcus melitensis* [316].

Хьюгс (Hugues), работая вместе с Брюсом, изучил и описал клинику болезни [316].

Банг и Стриболт (Bang and Stribolt) в 1897 г. в Дании [51] изучали эпизоотические abortionы коров и изолировали из матки коровы «абортогенную бациллу» (бациллу Банга), в 1902 году переименованную в *Bacterium abortus* [316].

Этиология заболевания человека оставалась неясной до тех пор, пока Заммит и Хоракс (Zammit and Horrocks), работавшие в 1904–1907 гг. в составе английской экспедиции по изучению средиземноморской лихорадки, не обнаружили эти бактерии в молоке клинически здоровых мальтийских коз, установив таким образом их роль в заражении человека [316].

Позже, в 1911 году, идентичные бактерии были обнаружены в коровьем молоке Шредером и Катоном (Schroeder and Cotton), Смитом и Фабьяном (Smith and Fabyan) [316].

Уилсон (Wilson), используя методы, предложенные Хеддльсоном, и реакцию agglutination с моноспецифическими сыворотками, первым ввел понятие «биотип» [316].

Вопрос о классификации бруцелл периодически подвергается обсуждению в связи с противоречивыми точками зрения у разных исследователей. С учетом высокой гомологии генома бактерий рода *Brucella* предложения об объединении входящих в него видов в один генетический вид обсуждаются и сегодня [259]. Однако классификация, предложенная Verger [181], согласно которой

все виды должны рассматриваться как биовары *B. melitensis*, не принята по ряду практических причин. Таким образом, в настоящее время действует таксономия, согласно которой род *Brucella* подразделяют на 13 видов: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. microti*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* и *B. Inopinata*, *Brucella papionis*, *Brucella vulpis* и *N.N.*\*

При этом *B. abortus* объединяет 7 биоваров, *B. melitensis* — 3 биовара, *B. suis* — 5 биоваров [194]. Остальные виды бруцелл на биовары не дифференцируются.

Действующая таксономическая схема разделения бруцелл в рамках рода *Brucella* по видам представляет определенные практические удобства, имеет эпизоотологическое и эпидемиологическое значение и отражает несомненный факт, что разные виды бруцелл обнаруживают преимущественную адаптацию к определенному виду животных и что бруцеллы вида *melitensis* особенно опасны для людей [50, 108].

Геном *Brucella* образован двумя циркулярными хромосомами размером 2,1 и 1,5 млн п.н. соответственно, за исключением 2 и 4 биоваров *B. suis* с размером хромосом 1,85 и 1,35 млн п.н. [242]. В хромосомах закодированы все метаболические и репликативные функции бруцелл. В естественных условиях плазмид у бруцелл не выявлено, но предполагается, что малая хромосома произошла из мегаплазмиды эволюционного предшественника бруцелл. Содержание гуанина и цитозина в хромосоме бруцелл составляет 55–59% [199].

В геноме бруцелл имеется три рРНК оперона, два из которых локализованы на большой хромосоме, а третий — на малой. Структурная организация рРНК у бруцелл: 5S, 16S, 23S, а также *ile-*, *ala-*, *met-mРНК* [193].

В геноме бруцелл отсутствуют гены «классических» факторов вирулентности других бактерий, патогенные остро-

ва и опероны, кодирующие полный набор факторов секреционных систем типов I, II и III.

Двухкомпонентная регуляторная система *BvrR* и *BvrS* играет ключевую роль в процессе инфекции макрофагов и внутриклеточного размножения бруцелл [166].

Регулятор *NodW* и гистидинкиназа *NodV*, по всей видимости, обеспечивают адаптацию бруцелл к внутриклеточному существованию и определенному виду хозяев соответственно. В условиях щелочной среды оперон *phaABCDE* инициирует синтез протеинов, участвующих в захвате протонов, поставляемых калиевым насосом. Продукт гем-катализного гена *katA*, который локализуется на малой хромосоме, защищает бруцелл от перекиси водорода в период нахождения внутри клеток. Имеются также гены двух супероксиддисмутаз, обеспечивающие резистентность бруцелл к клеточным супероксидам. Одна из них [*Fe-Zn*-супероксиддисмутаза] локализована на большой, а вторая [*Cu-Zn*-супероксиддисмутаза] — на малой хромосомах [193, 200].

**Морфологические, культуральные, тинкториальные свойства и выживаемость бруцелл во внешней среде и продукции животноводства.** По морфологическим и культуральным свойствам бруцеллы разных видов практически не отличаются между собой. Это мелкие грамотрицательные бактерии, размером от 0,3 до 0,6 мкм у кокковых или оvoidных и 0,6–2,5 мкм у палочковидных форм, неподвижны, споры и капсулы не образуют.

Для культивирования применяют МПА и МПБ с добавлением глицерина (2–3%) и глюкозы (1%). Можно использовать и другие питательные среды (картофельный агар, агар Альбими). Широко применяются коммерческие сухие стандартные среды разных производителей с pH 6,8–7,2. Посевы бруцелл культивируются при 36–38°C.

Для выделения первичных культур *B. abortus* требуется различие в атмосфере инкубирования CO<sub>2</sub>. При росте на плотных средах бруцеллы ряда видов продукции H<sub>2</sub>S.

Культуры *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* и *B. inopinata* пребывают преимущественно в S-форме и на плотных питательных средах формируют гладкие колонии, которые не окрашиваются раствором кристаллического фиолетового в разведении 1:2000 и не агглютинируются водным раствором акрифлавина в разведении 1:1000 и анти-бруцеллезными сыворотками, полученными на культуры в R-форме.

Дифференциацию бруцелл проводят на основании потребности первичных изолятов в CO<sub>2</sub>, способности культур бруцелл продуцировать H<sub>2</sub>S, чувствительности к бактериостатическим краскам (фуксину и тионину) и специфическим бактериофагам, по результатам типирования в РА с моноспецифическими сыворотками А и М [284]. Результаты этих методов позволяют идентифицировать разные виды бруцелл и выделять в них биовары. На сегодняшний день в связи с разработкой и внедрением в практику молекулярно-генетических тестов появилась возможность экспресс-идентификации бруцелл на уровне видов и даже штаммов.

Способность некоторых видов бактерий утрачивать клеточную оболочку и изменять фенотипические и биохимические свойства под воздействием факторов внешней среды была установлена Klieneberger-Nobel (1936). Первые сообщения о L-формах бруцелл сделаны американскими учеными Nelson E.L., Pickett M.J. (1951).

Бруцеллы трансформируются в L-формы под действием антибиотиков [В.В. Сочнев, 1998]. L-формы бруцеллы способны длительное время пер-

систировать в организме животных и человека, не выявляясь стандартными диагностическими методами и диагностиками. При благоприятных условиях они могут трансформироваться в исходные клеточные формы.

Бруцеллы относительно устойчивы к воздействию физических и химических факторов. Прямые солнечные лучи убивают бруцеллы за 4,5 ч. В почве они сохраняют жизнеспособность до 100 дн., в воде — до 114 дн. В естественных условиях при низкой температуре могут выживать до 160 дн., в высушенных плодных оболочках сохраняются до 120 дн., на одежде бруцеллы выживают до 14 дн. и более. В инфицированных сливках бруцеллы остаются жизнеспособными 10 дн., в масле — 41—67 дн., в сырах — 42 дня. В сыром молоке бруцеллы сохраняются до 1,5 мес., в охлажденном — 6—8 дн., в закисшем и при комнатной температуре — 1—4 дня. Высокая температура и дезинфицирующие растворы на бруцелл действуют губительно. В молоке при нагревании до 70°C они погибают за 10 мин., при 80—85°C — за 5 мин., а при кипячении — практически мгновенно.

Приведенные показатели выживаемости бруцелл не являются догмой, и в разных литературных источниках они могут несколько отличаться, так как данные показатели зависят от многих факторов, в том числе от ростообеспечивающих свойств питательных сред и селективных добавок, используемых при оценке их жизнеспособности, концентрации, а также степени контаминации исследуемого материала бруцеллами и посторонней микрофлорой.

**Источники и резервуар возбудителя бруцеллеза.** Основными источниками возбудителя болезни являются больные животные (крупный рогатый скот, яки, буйволы, бизоны, овцы, козы, лошади, свиньи, собаки и др.), выделяю-

щие бактерии во внешнюю среду с молоком, мочой, фекалиями, слизью из дыхательных путей, спермой, которые контаминируют при этом корма, воду, подстилку, полы и стены животноводческих помещений, предметы ухода за животными, территории пастбищ, водоемы и пр. Животные заражаются при контакте с больными животными, с фекалиями, мочой, молоком от больных особей через любые слизистые оболочки, в том числе аэрозольным и алиментарным путем, а также поврежденные и мацерированные кожные покровы.

Особую эпизоотическую и эпидемическую опасность представляют инфицированные стельные, сягные, супоросные и прочие животные, которые при aborte выделяют во внешнюю среду с плодом, околоплодными водами и плодными оболочками огромное количество бруцелл [129]. На территориях, эндемичных по бруцеллезу, резервуаром возбудителя могут быть собаки и дикие плотоядные. Факт самостоятельного заболевания диких животных некоторыми исследователями исключается, хотя культуры бруцелл были изолированы от большого числа диких видов млекопитающих, таких как бизон, лось, кабан, лиса, африканский буйвол и др. Резервуаром отдельных биотипов *B. suis* являются зайцы, а в районах Крайнего Севера РФ, на Аляске (США), северо-западных территориях Канады и на Юконе — северные олени (карибу). *B. ovis* может также мигрировать на животных других видов [157].

Человек является вторичным хозяином для бруцелл. Заболевание людей, за исключением случаев заражения персонала лабораторий, происходит при развитии эпизоотий.

Как правило, патогенные для человека бруцеллы разных видов избирательно инфицируют специфических животных. *B. abortus* вызывает заболевание

крупного рогатого скота (болезнь Банга). Также бруцеллами этого вида заражаются козы, дикие свиньи, лоси, яки, буйволы, верблюды, бизоны, собаки и другие животные. Причем некоторые из них способствуют носительству возбудителя болезни, являясь важным его источником при повторном заражении крупного рогатого скота [139, 196].

*B. melitensis* вызывает заболевание у коз и овец, иногда у крупного рогатого скота, *B. suis* — у свиней, зайцев, оленей, *B. canis* — у собак. Установлено заболевание людей при заражении культурами бруцелл перечисленных видов, в том числе *B. ceti* и *B. pinnipedialis*.

**Эпизоотология. Бруцеллез крупного рогатого скота.** Бруцеллез в стадах крупного рогатого скота распространяется главным образом во время abortов, при которых с плодами, последами и плодными водами выделяется большое количество бруцелл, загрязняющих подстилку, кормушки, остатки корма, шерсть и кожные покровы животных, в стойловый период содержания — полы и стены помещений, а в выгульный период — территории пастбищ и водоемы. В неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах при нормальном отеле инфицированных животных плодные воды и плодные оболочки также содержат возбудителя. Больные коровы после aborta или нормального отела, главным образом в первые 15–30 дней, выделяют возбудителя с истечением из родовых путей, с мочой и молоком. Это обуславливает его накопление во внешней среде и создает условия для перезаражения животных.

Массовое распространение бруцеллеза обычно наблюдают в стойловый период. Летом, особенно при содержании стада в лагерях, животные перезаражаются менее интенсивно. Причиной массового перезаражения крупного рогатого скота служит поение здоровых животных и животных неблагополучно-

го по бруцеллезу стада из непроточных водоемов.

Возможен механический перенос возбудителя быками-производителями при случке.

В благополучное стадо бруцеллез чаще заносят при вводе в него зараженных животных. Особую опасность в отношении распространения возбудителя могут представлять нетели, выращенные в неблагополучном по бруцеллезу хозяйстве.

Необходимо также учитывать возможность распространения возбудителя людьми, имевшими контакт с больными животными.

Нужно иметь в виду возможное эпизоотическое значение диких стадных животных (северных оленей, свиней, сайгаков) как источника возбудителя бруцеллеза.

При выяснении источников инфекции и путей заноса возбудителя, как и при организации противобруцеллезных мероприятий, необходимо учитывать возможность миграции его с животного одного вида на другой.

**Эпизоотическая ситуация.** К началу XXI века в ряде развитых стран бруцеллез искоренен или близок к искоренению. Благополучием по бруцеллезу считается отсутствие случаев его регистрации в течение по крайней мере 5 лет. К странам, благополучным по бруцеллезу, относятся Австралия, Великобритания, Дания, Канада, Кипр, Нидерланды, Новая Зеландия, Норвегия, Финляндия и Швеция [268]. Свободными от бруцеллеза животных считаются Республики Беларусь и Украина.

В то же время во многих странах мира бруцеллез по-прежнему представляет собой серьезную проблему ветеринарии и здравоохранения. Заболевание особенно распространено в средиземноморских странах Европы, Северной и Восточной Африке, ближневосточных

странах, Индии, Центральной Азии, Мексике, Центральной и Южной Америке. Причем отдельные территории в неблагополучных странах являются эндемичными по бруцеллезу.

В дореволюционной России и странах Средней Азии бруцеллез был известен под названием повального выкидыша и козьей лихорадки. Первые лабораторно подтвержденные случаи заболевания были диагностированы в 1912 г. А.А. Крамником в г. Ашхабаде и Е.А. Марциновским в г. Москве. В 1922 г. мальтийскую лихорадку у больных диагностировали А.Н. Крюков и В.А. Смирнов в г. Ташкенте, а затем П.Ф. Здродовский в Азербайджане. С этого времени в СССР началось всестороннее изучение проблемы бруцеллеза [149, 150].

С накоплением научных знаний об эпидемиологических особенностях бруцеллезной инфекции расширился ареал её очагов в различных регионах. Сложившаяся ситуация способствовала созданию в стране в 1936 г. сети бруцеллезных станций, что позволило создать школу исследователей, внесших огромный вклад в изучение данной зоонозной инфекции [22]. Массовое перемещение людей и животных в период Великой Отечественной войны и интенсивное передвижение породистых животных при восстановлении животноводства обусловили резкий рост заболеваемости населения бруцеллезом, внесли изменения в географию распространения бруцеллеза в стране. Послевоенный период характеризовался тщательным изучением этиологии, патогенеза, эпидемиологии бруцеллеза. Особое место занимали исследования по разработке мер профилактики бруцеллеза. Так, в 1952 г. были созданы первые аттенуированные живые вакцины для иммунизации людей и КРС. В работах советских и российских ученых широко освещены

особенности течения, сложности диагностики и лечения болезни, проблемы профилактики и эпидемиологического надзора бруцеллеза, находящиеся в ряду приоритетных проблем инфекционной патологии и новейшей истории эпидемиологического надзора за зоонозами [22, 28, 54].

Анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу крупного рогатого скота в нашей стране с 1902 года по настоящее время позволяет выделить в системе мер борьбы с этой болезнью в России и бывшем СССР условно три периода:

– 1-й период, протекавший с момента появления первых достоверно установленных случаев инфекции в стране с 1902 г. по 1952 год: борьба с бруцеллезом сводилась к проведению диагностических исследований и удалению из стад больных животных. Однако эти мероприятия были зачастую неэффективными. Заболевание имело тенденцию к широкому распространению. Так, если в 1946 году в СССР насчитывалось 8348 неблагополучных по бруцеллезу пунктов, в которых в течение года заболело 66 085 голов крупного рогатого скота, то в 1952 году эти показатели увеличились соответственно до 13 580 пунктов и 27 9584 животных;

– 2-й период, длившийся с 1953 по 1970 гг. и характеризующийся тем, что в стране начали применять вакцину из штамма *B. abortus* 19: с 1953 года — для иммунизации телок, а с 1955 года — и взрослого маточного поголовья крупного рогатого скота. Это позволило сократить количество неблагополучных по бруцеллезу пунктов с 13 543 до 3519. Вместе с тем в регионах и хозяйствах с широким распространением инфекции не удавалось добиться оздоровления и предотвратить появление новых неблагополучных пунктов. При этом выяснилось, что главным недостатком вакцины из штамма 19 является высокая агглюти-

ногенность. При серологическом исследовании после иммунизации отдельные животные положительно реагировали на бруцеллез более 2–3 лет. В итоге иммунизированных животных длительное время не подвергали диагностическим исследованиям, что приводило к пополнению в стадах числа бруцеллоносителей и способствовало широкому распространению инфекции. В 1970 году было принято решение о прекращении применения этой вакцины для иммунизации взрослого поголовья животных. С 1971 по 1974 гг. вакцину из штамма 19 применяли только для иммунизации телок 5–8-месячного возраста. По состоянию на 1 января 1974 года в СССР имелось 5570 неблагополучных пунктов, в том числе 528 пунктов, выявленных в предыдущем году, заболело в течение этого года 286,7 тыс. голов крупного рогатого скота;

– 3-й период, начавшийся с 1975 г. и продолжающийся по настоящее время, характеризуется тем, что в комплексе противобруцеллезных мероприятий предусмотрена иммунизация крупного рогатого скота разными вакцинами, но большей части животных — вакциной из штамма *B. abortus* 82. Вакцину из штамма 19 продолжают использовать для иммунизации небольшого количества телок 5–8-месячного возраста.

С 1997 года крупный рогатый скот в Алтайском крае и часть поголовья животных этого вида в Новосибирской и Тюменской областях, Красноярском крае, Хакасии и Тыва начали иммунизировать вакциной из штамма *B. abortus* 75/79-AB.

В 6 районах Саратовской области в течение 5 лет для иммунизации крупного рогатого скота с успехом применяли инактивированную адьювант-вакцину из штамма *B. abortus* KB 17/100 [13].

В целом в сравнении с началом третьего периода эпизоотическая ситуация по бруцеллезу крупного рогатого



Рис. 1

скота в Российской Федерации существенно улучшилась, но в течение последних 10 лет она практически не меняется (*рис. 1*).

Как видно из материалов *рис. 1*, количество пунктов, неблагополучных по бруцеллезу крупного рогатого скота, выделяемых ежегодно в течение последних десяти лет с 2010 по 2019 гг., было в пределах от 223 пунктов в 2010 году до 682 пунктов в 2014 году. Примерно на этом же уровне находятся минимальное и максимальное значения показателя количества пунктов, оздоровленных в течение года, составляющие соответственно 216 пунктов в 2010-м и 627 пунктов в 2014 году. Наименьшее количество оставшихся на конец года неблагополучных пунктов (112) было зарегистрировано в 2010 году, а наибольшее количество таких пунктов (294) пришлось на 2014 год. Минимальное количество

крупного рогатого скота, заболевшего бруцеллезом (около 5,9 тыс голов), было выявлено в 2018 году, а максимальное (12,8 тыс. голов) — в 2013 году. Представленные статистические данные обуславливают вопрос, почему ежегодно удается выявлять и ликвидировать примерно одинаковое количество неблагополучных пунктов, а показатели количества неблагополучных пунктов, остающихся в стране на конец каждого года, за последние 10 лет кардинально не снижаются.

Количественное сопоставление эпизоотологических показателей по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота (овец) в стране за последние 10 лет позволяет отметить, что их значения отличаются примерно на порядок, то есть в 10 раз (*рис. 2*).

В частности, количество пунктов, неблагополучных по бруцеллезу мелкого рогатого скота (овец), выявляемых ежегодно в течение последних десяти лет,

### Эпизоотологические данные по бруцеллезу мелкого рогатого скота в период с 2010 по 2019 гг.

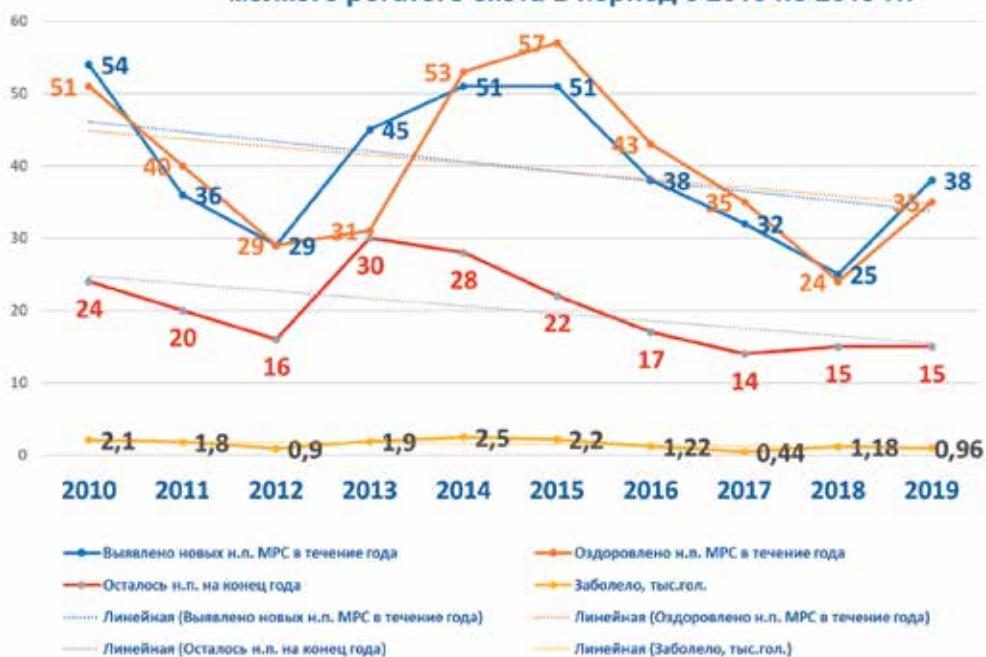


Рис. 2

было в пределах от 24 пунктов в 2014 году до 20 пунктов в 2013 году. Минимальное и максимальное значения показателей количества пунктов, оздоровленных в течение года, составили соответственно 24 пункта в 2018 году и 57 пунктов в 2014 году. Наименьшее количество оставшихся на конец года неблагополучных пунктов (14), было зарегистрировано в 2017 году, а наибольшее количество таких пунктов (30) пришлось на 2014 год. Наименьшее количество мелкого рогатого скота, заболевшего бруцеллезом в течение года (около 0,9 тыс. голов), было выявлено в 2012 году, а наибольшее (2,5 тыс. голов) — в 2013 году.

**Патогенез.** Бруцеллы проникают в организм разными путями: через не-поврежденные слизистые желудочно-кишечного, респираторного тракта и половых путей, а также через маце-

рированную кожу с микротравмами. Установлено, что бруцеллы продуцируют гиалуронидазу и нейраминидазу, которые разрушают мукополисахаридный остов эпителиальных клеток, что способствует преодолению барьера кожных и слизистых оболочек [Анина-Радченко Н.Д., 1954].

После проникновения в организм бруцеллы с током лимфы попадают в регионарные лимфатические узлы. При этом возможен перенос части возбудителя с кровью в другие органы и ткани, особенно богатые ретикуло-эндотелиальными элементами, где они могут длительное время сохраняться и размножаться.

Бруцеллы подвергаются фагоцитированию макрофагами и нейтрофилами. Однако они способны не только противостоять бактерицидным системам

фагоцитов, но и длительно выживать внутри них, скрываясь от губительного действия бактерицидных ферментов организма и белков крови (лизоцим, комплемент), а также антибиотиков и сульфаниламидов, используемых при лечении болезни и плохо преодолевающих клеточные мембранны.

Кроме того, возбудитель секретирует низкомолекулярное вещество (макрофаготоксин), которое, воздействуя на регуляторные системы фагоцита, увеличивает в нем содержание циклического аденоzinмонофосфата и снижает уровень циклического гуанозинмонофосфата. Индекс цАМФ/цГМФ в макрофаге увеличивается в 8–10 раз, что через каскад сложных реакций приводит к снижению подвижности лизосом. В итоге процессы сближения лизосом и фагосом, а также их слияние резко подавляются.

У так называемых неспециализированных («непрофессиональных») фагоцитов на процесс поглощения (клеток) требуются затраты энергии, а ингибирование энергетического метаболизма и рецептор-опосредованного эндоцитоза может привести к подавлению такого ответа.

Таким образом, большинство бруцелл быстро уничтожается при слиянии с фаголизосомами. Однако 15–30% могут выживать в постепенно формирующемся бруцеллезном компартменте, где наблюдается быстрая ацидификация. Как происходит образование этой уникальной структуры, до конца не ясно, но она ограничивает действие антибиотиков и объясняет несоответствие *in vitro* исследований и механизмов, происходящих *in vivo*.

Контакт бруцелл с клетками иммунной системы способствует образованию интерферона- $\gamma$ , индуцирует действие естественных киллерных клеток и Т-хелперных клеток непосредственно и через макрофаги.

Также индуцируется синтез В-лимфоцитами специфических антител, имеющих значение при иммунном ответе, но гораздо меньшее, нежели Т-хелперный ответ.

Репликация бруцелл в эндоплазматическом ретикулюме вначале проходит без влияния на целостность клетки хозяина. Хотя в конечном счете бруцеллы нарушают метаболизм фагоцитирующих клеток, в результате чего они погибают и лизируются. Вышедший во внеклеточное пространство возбудитель фагоцитируется новыми клетками, и процесс повторяется.

При этом отдельные клетки возбудителя или вместе с поглотившими их фагоцитами разносятся во все паренхиматозные органы (печень, селезенку и т.д.), а также в костный мозг и лимфоузлы.

Наибольший тропизм возбудитель имеет к половым органам (семенникам, придаткам семенника, тканям матки, особенно в состоянии стельности, сухости, супоросности, щенности и т.д.). В них развиваются множественные воспалительные процессы, которые носят хронический характер с периодическими обострениями (ремитирующий тип). Немалую роль в развитии патологии на тканевом уровне играют и реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Длительное течение болезни сопровождается серозно-продуктивным воспалением паренхиматозных органов, что приводит к атрофии паренхимы, склерозу стромы и множественным фиброзным отложениям.

Бактериемия у животных большинства разных видов непродолжительная, за исключением собак и свиней, у которых возбудитель может сохраняться в крови до 6 месяцев.

**Клиническая картина.** Бруцеллез, как правило, протекает в хронической

форме, часто с довольно неопределенными и нехарактерными клиническими признаками, которые могут наблюдаться и при других инфекционных заболеваниях. При этом важно учитывать, что среди других болезней, имеющих сходные клинические признаки, именно бруцеллез представляет наибольшую опасность. Причем у животных разных видов бруцеллез характеризуется не только общими симптомами, но и некоторыми особенностями проявления.

Основными признаками бруцеллеза у стельных коров и нетелей являются abortionы на 4–5-м месяце или на 6–8-м месяце. Время наступления аборта зависит от того, когда произошло заражение животного. Реже всего abortируют коровы, заразившиеся за 1–2 месяца до случки или на 7–8-м месяце стельности.

Основная масса abortionов приходится на более поздний период стельности, причем в большинстве случаев abortируют первотелки, иногда 30–50%. Как правило, одна и та же корова abortирует один раз, но у отдельных животных abortion может быть 2 и даже 3 раза.

За 2–3 дня до наступления аборта у коровы происходит припухание и покраснение наружных половых органов и наблюдается истечение из влагалища слизи светло-розового цвета без запаха. После аборта часто наблюдается задержание последа, эндометрит, иногда развивается мастит.

Кроме abortionов, у крупного рогатого скота может наблюдаться воспаление суставов конечностей, сопровождающееся часто сильным их опуханием (бурситы).

У быков, больных бруцеллезом, нередко наблюдаются орхиты.

Бруцеллез у буйволов проявляется в виде abortionов, обычно без задержания последа и других осложнений.

**Патологоанатомические изменения.** У больных бруцеллезом коров патологические изменения локализуются в лимфатических узлах, паренхиматозных и главным образом половых органах, в которых эти изменения можно обнаружить за несколько дней до abortionов. Они выражены гиперемией и опуханием вульвы и слизистой оболочки вагины, из которой выделяется жидкость красно-бурового цвета.

При abortionе у коров и овец плодовые оболочки студенисто инфильтрированы и местами покрыты хлопьями фибрина и гноя; плод часто отечен, в грудной и брюшной полостях жидкость с примесью крови. Матка увеличена, стенки ее утолщены, дряблые. Слизистая оболочка матки отечна, гиперемирована, с пятнисто-полосчатыми кровоизлияниями. У стельных коров молочная железа в состоянии интерстициального воспаления. Надвыменные и глубокие паевые лимфоузлы увеличены, плотные, серовато-белого цвета. Селезенка и печень увеличены. При разрезе селезенки довольно четко выступают фолликулы.

**Диагностика.** Важнейшей составляющей в комплексе противобруцеллезных мероприятий является диагностика болезни. Быстро установленный диагноз обуславливает своевременное проведение мероприятий по ликвидации источников и очагов инфекции, что способствует быстрому искоренению бруцеллеза. В связи с этим разработке и усовершенствованию бактериологических, биологических, серологических и аллергических методов диагностики болезни придается большое значение.

Наиболее широко в ветеринарной практике используются серологические методы исследования на бруцеллез, результаты некоторых из них дают право на постановку диагноза [108].

## Серологические методы диагностики бруцеллеза

**Реакция агглютинации (РА).** Реакцию агглютинации стали применять для диагностики бруцеллеза одной из первых [19, 77, 98, 111, 151, 228]. Со временем было установлено, что исследование проб сыворотки крови в РА в начальный период болезни позволяет выявить большее количество больных бруцеллезом животных, чем исследование в более поздние сроки с момента заболевания [9, 18, 25, 70, 74, 82, 97, 99, 120, 208]. При массовых исследованиях проб сыворотки крови в этой реакции был установлен феномен зоны (прозоны), в некоторой степени снижающий диагностическую ценность реакции. Прозоной считают отсутствие агглютинации антигена сывороткой в малых разведениях (1:25, 1:50) и наличие ее при исследовании сывороток в последующих разведениях. Исчерпывающего объяснения этому феномену нет. Некоторые исследователи считают возможной причиной прозоны присутствие в сыворотке крови неполных антител или их более высокийavidитет к антигену по сравнению с полными антителами. Возможно, причиной проявления прозоны являются некоторые физико-химические изменения в структуре белков сыворотки крови, о чем свидетельствует более частое блокирование антигена сыворотками, инактивированными при температуре 70°C [32].

В результате усовершенствования РА в пробирках была предложена, как казалось вначале, более специфичная, чувствительная, экономичная по времени постановки и используемым средствам пластинчатая РА на стекле [191, 304]. Однако при исследовании длительно хранившихся проб сыворотки крови в пластинчатой РА было отмечено появление неспецифических реакций [53, 58, 62, 83].

**Роз бенгал проба (РБП).** Одной из модификаций пластинчатой РА является реакция агглютинации с антигеном, окрашенным бенгальским розовым и суспендированным в забуференном физиологическом растворе с pH 3,65.

Пластинчатая агглютинация с пластинкой крови и окрашенным антигеном была разработана в США [283]. Ее модификация с сывороткой крови, роз бенгал пластинчатый тест или роз бенгал проба (РБП) предложена английскими исследователями [260].

Этот метод был глубоко и всесторонне изучен в СССР [7, 8, 12, 33, 41, 43, 44, 64, 89, 132, 146, 162].

РБП является специфичным и высокочувствительным тестом. Основным достоинством реакции является простота постановки и возможность выявлять больных бруцеллезом животных в ранние сроки после заражения [40, 64, 145, 162].

**Реакции связывания комплемента (РСК) и длительного связывания комплемента (РДСК).** Впервые для диагностики бруцеллеза РСК была применена Holt в 1909 году, которому с помощью этой реакции удалось распознавать больных бруцеллезом животных задолго до появления у них клинических признаков болезни. В результате дальнейшего изучения отечественными и зарубежными исследователями РСК была признана высокочувствительным и специфичным методом диагностики бруцеллеза [55, 126, 127, 136, 185].

Результаты исследования проб сыворотки крови в РА и РСК совпадают не всегда [1, 18, 23, 35, 53, 62, 81, 82, 97, 279], причем РСК превосходит по чувствительности РА [87, 138].

Согласно данным ряда авторов, изучавших возможность диагностики бруцеллеза с использованием РА и РСК

у животных с различной давностью инфекции, было установлено, что комплементсвязывающие антитела появляются в сыворотке крови животных позже, чем агглютинины, но сохраняются дольше последних [65, 121, 125, 135].

В целом РСК является достоверным, но относительно трудозатратным, особенно в полевых условиях, методом серологической диагностики бруцеллеза [130].

С учетом результатов постановки РСК при различных температурных режимах была предложена РДСК, которая в некоторых случаях является более чувствительной и специфичной, чем РСК [58, 102, 123, 124].

Определенный интерес представляет обнаружение в инфицированном организме бруцеллезного антигена в РДСК с высокоактивной диагностической сывороткой [51]. Возможность использования РДСК для обнаружения антител с целью ранней диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота была подтверждена исследованиями Аливердиева А.А. [5, 115].

По данным Ромахова В.А., в свежих очагах бруцеллеза крупного рогатого скота, сыворотка крови которого не реагирует в РА и РСК, исследование материала от этих животных на наличие антигена в РДСК дает положительный результат. В дальнейшем такие коровыabortируют и уже положительно реагируют на бруцеллез в РА и РСК [110].

Жованик П.Н. исследовал материал от 128 животных неблагополучного по бруцеллезу стада в РДСК и обнаружил у 60 голов бруцеллезный антиген. При этом пробы сыворотки крови от животных, у которых выявили наличие антигена, реагировали положительно в РА и РДСК [50].

**Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).** Сущность этой реакции заключается в том, что эритроциты после адсорбции на их поверхности спе-

цифических растворимых антигенов различной природы (полисахариды, липополисахариды, белки и др.) агглютинируются в присутствии гомологичных сывороток или антигена.

Впервые при бруцеллезе РНГА была испытана Carrere L. и Roux J. Для сенсибилизации эритроцитов они использовали надосадочную жидкость антигена из *B. abortus*, применяемого для постановки РА, а также водный экстракт бруцелл [187].

Pressman D. et al. при изготовлении эритроцитарного диагностикума использовали для сенсибилизации эритроцитов полисахаридную фракцию *B. abortus* [283].

ДагНИВИ, ВНИИБТЖ и ФГБУ «ВГНКИ» внедрен в практику набор для диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота РНГА с антигеном, изготовленным по новой технологии. В процессе разработки антигена было установлено, что его специфичность и активность определяются способом получения сенситина. Оптимальным признано экстрагирование сенситина из бактериальной суспензии культуры бруцелл в 12% растворе хлорида натрия при 120°C с последующей обработкой алкилсульфатом натрия.

Согласно результатам исследований, РНГА с указанным антигеном позволяет выявлять больных животных в большем количестве и в более ранние сроки, чем РБП, РА, РСК и РДСК вместе взятые.

**Кольцевая реакция с молоком.** Впервые кольцевая реакция с молоком (КР) для исследования дойных коров на бруцеллез была предложена Fleichauer O. [214].

В результате многочисленных исследований было установлено, что кольцевая реакция с молоком является специфичным и чувствительным методом диагностики бруцеллеза у животных с острым и хроническим течением

инфекции и может применяться для контроля благополучия дойных стад по бруцеллезу [30, 36, 69, 72, 79, 80, 84, 86, 96, 106, 128, 131], а также при контроле на бруцеллез индивидуальных и сборных образцов коровьего молока коров.

Выполнены работы, посвященные разработке набора по диагностике бруцеллеза овец в кольцевой реакции с молоком.

**Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД).** РИД при диагностике бруцеллеза с использованием в качестве антигена полисахарида В, полученного из культуры бруцелл в S-форме, была предложена R. Diaz с соавторами в качестве теста, позволяющего отличить постvakцинальные антитела от антител, синтезированных в организме животного, инфицированного полевой культурой бруцелл [203, 204, 205]. Методика получения диагностического О-полисахаридного (ОПС) антигена из культур *Brucella melitensis* и *Brucella abortus* и его применения в различных тестах была предложена канадскими учёными J.W. Cherwonogrodzky, K. Nielsen и др. [184, 188, 227, 244, 245, 266]. Продолжительное применение РИД позволило в полной мере оценить достоинства теста и выявить основной недостаток, связанный с его низкой чувствительностью, особенно в сравнении с разработанным в 1990-е гг. инструментальным экспресс-анализом диагностики бруцеллеза с меченым флуоресцеином ОПС-антителом — методом флюоресцентной поляризации (МФП) [267]. После 2000 года официальные документы МЭБ рекомендуют использование ОПС-антитела при проведении иммуноферментного анализа (ИФА) и МФП, которые значительно более чувствительные по сравнению с чувствительностью РИД [182].

В РФ для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, мелкого ро-

гатого скота и северных оленей применяется РИД с S-ОПС-антителом, для диагностики бруцеллеза собак — РИД с R-антителом бруцелл.

В 1979 году для дифференциальной серодиагностики бруцеллеза от других болезней, вызываемых возбудителями, имеющими антигенное родство с бруцеллами, было предложено исследовать сыворотки крови животных в реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) с высокоочищенными фракциями антигенов бруцелл [202]. Впоследствии этот метод воспроизвели многие исследователи, но низкий выход препарата затруднил внедрение его в практику.

В 1988 году был разработан новый способ выделения О-полисахаридного (ОПС) антигена из бруцелл, использование которого в РИД позволяло дифференцировать животных, иммунизированных вакциной из штамма 19, от больных бруцеллезом [202].

В.М. Чекишев с соавторами получили ОПС-антитела для РИД с несколько иными свойствами. Авторам удалось, применяя свой препарат, дифференцировать животных, иммунизированных и многократно реиммунизированных вакцинами из штаммов 19 и 104М, от животных, естественно инфицированных бруцеллезом и иерсиниозом [142].

Производственное использование РИД с ОПС-антителом позволило сделать вывод, что реакция уступает по чувствительности классическим РА и РСК, но дает ценную информацию при оценке благополучия хозяйств, в которых общепринятыми серологическими методами выявлены единичные положительно реагирующие на бруцеллез животные, особенно если они многократно иммунизированы противобруцеллезными вакцинами.

Для повышения чувствительности метода иммунодиффузии и возможности выявления бруцеллезных сыворо-

ток с титром в РСК 1:20 рекомендуется использовать общепринятую в международной практике схему постановки реакции, предусматривающую внесение исследуемых сывороток в лунки, находящиеся рядом с лункой, в которую внесена положительная контрольная сыворотка [118].

Исследование в РИД с ОПС сыворотки крови маточного поголовья крупного рогатого скота через 1,5–2,5 месяца после иммунизации против бруцеллеза высокоагглютиногенными вакцинами позволяет выявлять и удалять из стада больное поголовье животных, что повышает эффективность оздоровительных мероприятий [6].

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Идея пометить антигены или антитела, меченные ферментом в качестве своеобразного детектора образования комплекса антиген–антитело, была реализована в конце 1960-х годов [211].

С тех пор как в 1971 году ферменты были предложены в качестве метки при проведении иммуноанализа, опубликованы тысячи работ и ряд обзоров, посвященных различным аспектам применения ИФА [56]. Nakane P.K. и Kawaoi A. предложили называть этот метод ELISA (от англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), что означает ферментзависимый иммуносорбционный анализ [262]. Самое распространенное название этого метода в отечественной литературе — иммуноферментный анализ (ИФА).

Одним из самых распространенных является вариант твердофазного ИФА, при котором используется адсорбционная иммобилизация антигенов (антител) на поверхности полимерных материалов (полистирол, поливинилхлорид и др.) [174, 183, 239]. Широко распространен метод физической адсорбции антигенов и антител на поверхности полистироловых микроплат [175].

Рядом отечественных и зарубежных исследователей выполнены работы, посвященные возможности применять ИФА для диагностики бруцеллеза [171, 189, 323].

Многие авторы пытались сравнить ИФА с традиционными методами серологической диагностики бруцеллеза — РА, РСК, РБП, РНГА, РНИФ и др., но результаты при этом оказались противоречивыми [49, 92, 222, 285].

Результаты многочисленных исследований демонстрируют диагностические возможности ИФА при выявлении как общих противобруцеллезных антител, так и отдельных их классов и субклассов: IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>. Сравнение титров IgM и IgG авторы использовали при разграничении острой и хронической форм болезни, а также для дифференциации бруцеллеза от иерсиниоза, вызванного *Y. enterocolitica* [91, 177, 226, 212, 243, 192, 300].

Gilbert G.L. и Hawes L.A. установили преимущество ИФА при обследовании больных животных, но считают, чторяду с ИФА все же следует применять и традиционные тесты [217].

Несмотря на многочисленность серологических методов, предложенных и применяемых для диагностики бруцеллеза, они не всегда позволяют исключить другие заболевания животных, вызванные *Yersinia enterocolitica* серовар 0:9, *Pasteurella*, *Campylobacter* и другими бактериями, имеющими антигенное сходство с бруцеллами [48, 164, 195, 229, 230, 282, 297].

Следует отметить, что серологическую диагностику затрудняют результаты, регистрируемые при исследовании животных, иммунизированных живыми противобруцеллезными вакцинами, индуцирующими синтез и длительную персистенцию в их организме агглютинирующих и комплементсвязывающих антител, не отличающихся от антител,

вырабатывающихя на полевые культуры бруцелл [134].

**Аллергическая диагностика бруцеллеза.** Развитие инфекционного или вакцинального процесса при бруцеллезе сопровождается и аллергической перестройкой организма [35, 45, 52, 68, 71, 73, 93, 159, 249].

Многие авторы, изучая аллергическую реакцию у животных, сенсибилизированных измененными формами возбудителя, считают, что такая проба в данном случае приобретает особую ценность. Она позволяет выявлять дополнительно к серологическим методам до 20% инфицированных животных. Согласно результатам некоторых исследований, показания аллергических реакций у больных овец отличаются постоянством и сохраняются дольше, чем серологические реакции. Все это позволяет считать эффективным комплексное применение аллергического и серологических методов диагностики бруцеллеза [24, 35, 46, 100, 143, 318].

Важнейшим условием применения бруцеллина является отсутствие в его составе липополисахаридного антигена бруцелл.

Бруцеллин обладает способностью вызывать аллергическую реакцию у животных, инфицированных как типичными, так и измененными формами бруцелл.

**Бактериологическая диагностика бруцеллеза.** Бактериологическая диагностика бруцеллеза включает в себя бактероскопию, выделение чистой культуры возбудителя (культуральный метод) и постановку биопробы на морских свинках [23, 99].

Мазки-отпечатки из патологического материала окрашивают по Граму и специальными методами — по Козловскому, Шуляку–Шину, Стампу, модифицированным методом Циль–Нильсена, позволяющим дифференцировать бруцеллы от морфологически сходных бак-

терий. При всех способах окраски бруцеллы имеют красный цвет, цвет фона препарата и других бактерий зависит от метода окраски и может быть зеленым или синим [105, 113].

Выделение чистой культуры возбудителя при бактериологическом исследовании испытуемого материала является основанием для постановки диагноза на бруцеллез [23, 85, 105]. Относительная эффективность культурального метода исследования объясняется тем, что его результаты зависят от качества питательных сред, концентрации возбудителя в исследуемом материале, степени загрязненности материала постоянной микрофлорой, а также времени, прошедшего с момента заражения животного. Срок бактериологического исследования составляет 15–30 дней, а при постановке биологической пробы он увеличивается до 45 дней [148]. Кроме того, в случае иммунизации животных живыми противобруцеллезными вакцинами необходимо проводить исследование выделенной культуры с целью подтверждения, что выделенная культура не является вакциной, а это также требует существенных затрат рабочего времени и в ветеринарных лабораториях практически не выполняется.

**Молекулярно-генетическая диагностика.** Достижения современной биотехнологии позволили, используя молекулярно-генетические подходы, разрабатывать новые высокочувствительные, специфичные, достаточно простые и быстрые в плане получения результата методы, одним из которых является полимеразная цепная реакция (ПЦР) 261, 301].

Несколько авторов сообщили об успешном использовании этого метода для родовой или даже видовой идентификации бруцелл [34, 213, 238, 292].

В частности, Leal-Klevezas D.S. et al. [307] использовали ПЦР для диагностики бруцеллеза у двадцати двух самок

и одного самца, выбранных произвольно среди 300 клинически здоровых коз. Чувствительность метода сравнивали с наиболее часто используемыми методами — бактериологическим и серологическими. Результаты исследования демонстрируют более высокую чувствительность ПЦР в сравнении с РБП и бактериологическим методом и обуславливают перспективность применения метода для быстрой идентификации типов *Brucella*.

Romero C. et al. [213, 292] исследовали методом ПЦР и ИФА образцы молока от 56 коров, больных бруцеллезом, и от 37 коров из благополучного по бруцеллезу стада. Хотя результаты позволяют считать ИФА лучшим тестом, чем ПЦР, комбинированная чувствительность обоих тестов составила 100%, и их одновременное применение для быстрой диагностики бруцеллеза в молочном скотоводстве могло бы быть более полезным, чем применение одного из тестов.

Для некоторых целей идентификация бруцелл на видовом уровне не является необходимой для начальных действий, например в диагностике человеческого бруцеллеза или контаминации пищевых продуктов. В этих случаях достаточно родоспецифического ПЦР-анализа. Однако существует много примеров, когда определение вида бруцелл необходимо для начала конкретных действий. Например, противоэпизоотические мероприятия, проводимые в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, строго видоспецифичны. Более того, дифференцирующие анализы чрезвычайно необходимы для выяснения источника инфекции в эпидемиологии [2].

Leyla, Kadri успешно применили тест-систему AMOS (*abortus*, *melitensis*, *ovis*, *suis*) для тестирования содержимого желудков abortированных плодов овец, контамированных культурами бруцелл. Данными исследованиями была

подтверждена высокая специфичность и чувствительность данной тест-системы, которые составили 100 и 97,4% соответственно [240].

Полиморфизм, основанный на расположении в геноме бруцелл I S элементов, имеет перспективы для выявления новых видов и биоваров бруцелл [285] и был успешно применен для типирования биоваров, обнаруженных у морских млекопитающих [190].

**Полиморфизм известных последовательностей ДНК, или ПДРФ-анализ.** Одним из основных методов генотипирования микроорганизмов является анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, так называемый ПДРФ-анализ (иначе RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism), основанный на использовании эндонуклеаз рестрикции. При проведении ПДРФ-анализа получают наборы рестрикционных фрагментов (паттерны) от изучаемого генома или отдельных генов.

ПДРФ-анализ имеет ряд достоинств:

- выявляемые ПДРФ-маркеры обладают высоким консерватизмом, что позволяет использовать их для сравнительного картирования родственных видов;
- дает возможность выявлять даже те изменения, которые не связаны с уровнем генной экспрессии.

ПДРФ-анализ широко используется для решения различных задач микробиологии и эпидемиологии. Основные задачи, решаемые с помощью этого метода:

- дифференциация близкородственных сходных по фенотипу штаммов возбудителей инфекционных болезней, характеризующихся различной эпидемиологической значимостью;
- выяснение особенностей циркуляции возбудителей инфекционных болезней в эпидемических очагах, популяциях людей, окружающей среде с помощью исследования генетической структуры этих возбудителей;

— изучение механизмов адаптивной изменчивости патогенных видов мицроорганизмов [37].

**Полиморфизм генов, кодирующих внешние мембранные белки бруцелл.** В 1996 Da Costa при тестировании шести генов бруцелл (*BCSP31*, *16S rRNA*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ*, *htrA*) с помощью ПДРФ-анализа не обнаружил полиморфизм ни в одном гене [302].

Cloeckaert (2000), используя ПДРФ-анализ для исследования полиморфизма семи генов, ассоциированных с LPS-О антигенным синтезом, также не выявил никаких значительных отличий [190].

Наиболее перспективными для дифференциации бруцелл являются гены, кодирующие внешние мембранные белки (outer membrane protein OMP0: локус *omp2*, гены *omp31* и *omp25* [206].

Особое значение имеет полиморфизм локуса *omp2*, определяющего чувствительность бруцелл к красителям, что служит одним из основных методов типирования бруцелл. Локус *omp2*, охарактеризованный Ficht et al. (1989), содержит два близкородственных гена, *omp2a* и *omp2b*, каждый из которых кодирует наружный мембранный белок размером 36 кДа. Они разделены фрагментом в 900 п.н. и ориентированы в противоположных направлениях. Ficht заметил, что 1, 2 и 4 биовары *B. abortus* содержат делецию в 115 п.н. в гене *omp2a*. Этот полиморфизм был использован Leal-Klevezas et al. (1995) при разработке ПЦР-теста для дифференциации *B. abortus* от других видов бруцелл. Ficht также показал, что все виды содержат по одной копии генов *omp2a* и *omp2b*, за исключением *B. ovis*, у которого отсутствует ген *omp2b* и имеется 2 копии гена *omp2a* [180, 206, 290].

ПДРФ-анализ локуса *omp2* стал методом, широко используемым во многих лабораториях для дифференциальной идентификации видов бруцелл или для

описания новых видов или штаммов [319, 320].

ПДРФ-анализ гена *omp25* показал высокую гомологию этого гена, молекулярные маркеры были найдены только для *B. ovis* и *B. melitensis* 1, 2 и 3 биоваров [190, 279].

Клонирование и определение последовательности гена *omp31* *B. melitensis*, кодирующего иммуногенетический белок, локализованный в наружной мембране бруцелл, подтвердило то, что этот ген присутствует у всех видов бруцелл, за исключением *B. abortus*. Более того, у *B. abortus* отсутствуют фланкирующие этот ген участки ДНК, таким образом, размер делеции составляет примерно 25 т.п.н. [206, 319, 320].

Vizcaino et al. [320] дифференцировали большинство видов бруцелл с помощью ПДРФ-анализа локуса *omp31*. Однако этот метод не смог дифференцировать *B. suis* от *B. neotomae*, но позволил идентифицировать специфический маркер *B. canis*. Более того, были найдены специфические маркеры для *B. ovis* и *B. suis* биовара 2 [206, 319, 320].

Таким образом, суммарные данные ПДРФ-анализа генов *omp2a*, *omp2b*, *omp25* и *omp31* позволили дифференцировать все шесть видов бруцелл, а также некоторые их биовары [193, 206].

Методы молекулярно-генетической дифференциации бруцелл на уровне штаммов приобретают все большее значение в медицинской и ветеринарной практике. В последнее десятилетие апробируются новые подходы к дифференциации бруцелл на основе результатов анализа локусных вариабельных tandemных повторов возбудителя (multiple locus variable tandem repeats analysis — MLVA, или VNTR) с праймерами, ограничивающими эти локусы. В связи с тем, что в геномах

бруцелл может быть более 100 тандемных повторов длиной от 8 и более нуклеотидных пар разной копийности, имеющих видовой и штаммовый генетический полиморфизм, метод позволяет выходить на новый уровень дифференциации возбудителя бруцеллеза, что позволит не только дифференцировать вакциновые штаммы от полевых изолятов, но и устанавливать источник возбудителя в случае вспышки болезни, изучать пути передачи, резервуары

и ареалы распространения конкретных изолятов бруцелл [78, 327].

Очевидно, что в будущем широкое практическое использование иммуноферментного анализа и молекулярно-генетических тестов может повысить эффективность диагностики бруцеллеза животных. По состоянию на 2020 год в Российской Федерации в диагностической ветеринарной практике применяются разные диагностические тесты (табл. I).

**Таблица 1. Перечень средств и методов диагностики бруцеллеза животных, применяемых в Российской Федерации**

Название диагностического средства [организация-производитель]	Название реакции или метода, антиген	Интерпретация результата
Разработаны и внедрены в практику до 2000 г.		
1. Набор компонентов для диагностики бруцеллеза животных в РА, РСК, РДСК – [ФКП «Щелковский биокомбинат»]	Реакция агglutinacji [РА], антиген	подтверждающий диагноз
	Реакция связывания комплемента, S-LPS	подтверждающий
2. Набор компонентов для диагностики бруцеллеза животных в роз бенгал пробе – [ФКП «Щелковский биокомбинат»]	Роз бенгал проба [РБП] [экспресс-тест], S-LPS	ориентировочный
3. Набор компонентов для диагностики бруцеллеза животных в кольцевой реакции с молоком – [ФКП «Щелковский биокомбинат»]	Кольцевая реакция с молоком [КР], S-LPS	ориентировочный
4. Набор для серологической диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) – [ООО «Ветмедсервис»]	Реакция непрямой гемагглютинации [РНГА], S-LPS	подтверждающий [альтернативный]
5. Тест-система для диагностики бруцеллеза крупного и мелкого рогатого скота и северных оленей в РИД – [ООО НПЦ «ВетБиоТест»]	Реакция иммунодиффузии в агаровом геле, S-OPS	подтверждающий [дифференциальный]
6. Набор для выявления антител к антигену S-LPS <i>Brucella abortus</i> и <i>Brucella melitensis</i> иммуноферментным методом «Бруцелла-СЕРОТЕСТ» – [ООО «Ветбиохим»]	Конкурентный иммуноферментный анализ, S-LPS	подтверждающий [альтернативный]
Разработаны и внедрены в практику после 2000 г.		
7. Набор для выявления иммуноферментным методом собак и других плотоядных, инфицированных <i>B. canis</i> [ФКП «Курская биофабрика»]	Конкурентный иммуноферментный анализ с R-антителом	подтверждающий [альтернативный]
8. Набор для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого <i>B. canis</i> , в реакции агглютинации и реакции иммунодиффузии – [ООО «АгроВет»]	РА и РИД с R-антителом	подтверждающий

продолжение таблицы

Название диагностического средства [организация-производитель]	Название реакции или метода, антиген	Интерпретация результата
9. Набор для дифференциальной серологической диагностики бруцеллеза и контроля иммунного ответа крупного рогатого скота, иммунизированного вакциной из штамма <i>B. abortus</i> 82 — [ФКП «ФЦТРБ»]	РСК с R-антигеном	подтверждающий [дифференциальный]
10. Иммунохроматографическая тест-система для определения антител к ЛПС антигену <i>B. abortus</i> и <i>B. melitensis</i> в сыворотке крови крупного рогатого скота и овец — [ФКП «Курская биофабрика»]	Иммунохроматографический, S-LPS	ориентировочный
11. Набор для диагностики бруцеллоза крупного и мелкого рогатого скота иммуноферментным методом — [ООО «Научно-производственная фирма «Иммунобиотех», г. Курск]	Непрямой иммуноферментный анализ [ИФА] S-OPS	подтверждающий [альтернативный]
12. «Набор диагностический для выявления индивидуальных специфических антител класса G к бактериям рода <i>Brucella</i> в сыворотке [плазме] крови крупного рогатого скота иммуноферментным методом» — [ООО «Сиббиотест» [г. Новосибирск]	Конкурентный иммуноферментный анализ S-LPS	подтверждающий
13. Тест-система «Бру-ком» для выявления возбудителя бруцеллеза животных методом полимеразной цепной реакции — [ООО «Интер ЛабСервис»]	Полимерная цепная реакция [ПЦР]	подтверждающий

С учетом международной торговли животными и животноводческой продукцией представляется целесообразным проведение национальными надзорами разных стан гармонизации перечней средств диагностики бруцеллеза животных, порядка их применения и унификации оценки однотипных диагностических тестов, исходя из требований и рекомендаций, изложенных в Руководстве Международного эпизоотического бюро по диагностическим тестам и вакцинам (табл. 2).

Чтобы повысить эффективность исследования при оздоровлении неблагополучных стад/групп, рекомендуется параллельное тестирование с целью повышения чувствительности диагностики, т.е. использование двух серологических тестов, например, **ВВАТ** или **FPA** и **CFT** или **I-ELISA**. Чувствительность может быть увеличена путем па-

раллельного серологического и аллергического тестирования.

В инфицированных стадах положительный результат любого серологического теста может рассматриваться как подтверждение клинического случая. В зонах с низким уровнем распространенности или почти свободных зонах одиночные серологические реакции могут быть подтверждены выделением культуры (культуральный метод), или ДНК возбудителя (PCR), или положительным результатом аллергического исследования с бруцеллином (**BST**).

В неэндемичных районах клинические или серологические подозрения должны почти всегда быть подтверждены выделением культуры (или ДНК — в ПЦР) или в аллергической пробе (**BST**). В зонах, где проводится подкожная вакцинация S19 или Rev.1, этот тест может помочь в дифференцировании антител.

Таблица 2. Разработанные тесты для диагностики болезни, вызываемой *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* (Руководство по диагностическим тестам и вакцинам, OIE, 2016)

Purpose/Цель исследования						
Method / Метод	Population freedom from infection / Исследование популяции, свободной от инфекции	Individual animal freedom from infection / Отдельная свобода животных от инфекции	Contribute to eradication policies / Исследование в рамках программы искоренения болезни	Confirmation of suspect or clinical cases / Исследование с целью подтверждения болезни у подозреваемых в заражении, в том числе у животных с клиническими признаками болезни	Herd/flock prevalence of infection — surveillance / Распространенность инфекции в стаде/отаре — наблюдение	Immune status in individual animals or populations post vaccination / Оценка иммунного статуса у отдельных животных или популяции после вакцинации
Agent identification / Выделение возбудителя						
Бактериоскопический метод	—	—	—	+	—	n/a
Culture / Выделение чистой культуры возбудителя	—	—	—	+++	—	n/a
PCR d / Полимеразная цепная реакция — ПЦР	—	—	—	+/-	—	n/a
Detection of immune response / Оценка иммунного статуса						
BBAT / тесты с забуференными антигенами [RBT or BPAT] [РБП или РА]	+++	++	+++	+	+++	n/a
FPA/МФП	++	++	+	++	++	n/a
CFT/РСК	++	++	+++	++	+++	n/a
I-ELISA/ИФА	+++	++	+++	++	+++	n/a
C-ELISA/ИФА	++	+	+	+	++	n/a
BST/аллергия	++	—	+	+++	++	n/a
SAT/РА	++	+	+	—	+	n/a
NH and cytosol protein-based tests / Неполные антитела	—	—	+	++	—	n/a
Bulk milk tests (Milk I-ELISA or Milk ring-test) / ИФА с молоком или КР с молоком	+++	—	+++	+	+++	n/a

Ключ: [+] — рекомендуемый метод; [+] — подходящий метод; [+] — может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы сильно ограничивают его применение; [—] — не подходит для исследования с указанной целью; [n/a] — не применимо.

**ПЦР** — полимеразная цепная реакция; **BBAT** — тесты с забуференными бруцеллезными антигенами (т.е. RBT (роз бенгал тест) и BPAT (забуференная пластинчатая реакция агglutinacji)); **FPA** — флуоресцентный поляризационный анализ; **CFT** — реакция связывания комплемента; **I** или **C-ELISA** — непрямой или конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ; **BST** — бруцеллиновый кожный тест; **SAT** — реакция агглютинации; **NH** — гаптеновый тест для выявления неполных антител, распространяется только на стадах/группах, странах или зонах, свободных от бруцеллеза.

**Специфическая профилактика.** Разработкой средств специфической профилактики бруцеллеза в мире начали заниматься практически с момента открытия его возбудителя. Так, Банг [173], впервые выделивший из околоплодной жидкости abortirovавшей коровы микроорганизмы, подобравший среду и оптимальные условия для их культивирования и путем заражения животных доказавший, что выделенные микроорганизмы являются возбудителем инфекционного аборта, пришел к мысли о наличии иммунитета при данном заболевании. Еще более он убедился в этом, наблюдая случаи самовыздоровления животных от инфекционного аборта. Учитывая это, Банг сделал вывод о возможности и необходимости специфической профилактики болезни. Работать в этом направлении стали многие исследователи и в первую очередь он сам.

В 1906 году Банг сообщил о результатах экспериментов, в которых ему удалось сформировать иммунитет у беременных овец, коз и коров, прививая им живые вирулентные культуры бруцелл. В 1909 году впервые в полевых условиях он применил внутривенное введение животным живых бульонных культур бруцелл, в результате чего у них формировался иммунитет определенной степени напряженности, но наряду с этим проявлялись признаки анафилактического шока.

Начиная с 1910 года в Англии, Германии, Дании, США, Аргентине для массовых прививок молодняка и нестельных коров в благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах использовали агаровые смывы культур бруцелл. Хотя при этом количество абортоов у животных несколько снижалось, ущерб, наносимый инфекцией, был примерно таким же, как и при естественном течении болезни. Широкое применение вирулентных культур вызывало аборты у стельных животных и фактически при-

водило к их массовому искусственному заражению. Вакцинированные животные представляли эпизоотическую и эпидемическую опасность.

В связи с этим для изготовления вакцин стали применять штаммы с ослабленными вирулентными свойствами. Снижения вирулентности добивались, воздействуя на вирулентные культуры бруцелл химическими, физическими и биологическими способами. При этом некоторым из исследователей удалось достичь существенного успеха.

Так, Cotton W.E., Buck J.M., Smith H.E. [197] в 1934 году, работая с культурой штамма *B. abortus* 19, выделенной J.M. Buck в 1923 г. из молока коровы третьего отела и спонтанно снизившей вирулентность после хранения в течение одного года при комнатной температуре, селекционировали иммуногенный и стабильный штамм. Впоследствии этот штамм получил название Buck-19 [B-19] в честь автора исходной культуры. С этого времени начинается новый этап в разработке противобруцеллезных вакцин, а вакцина из штамма 19 с тех пор и до настоящего времени остается эталоном иммуногенности. Иммунизация этой вакциной еще не заразившихся коров при вспышке бруцеллезной инфекции предохраняет их от заражения и абортоов [176, 178, 234, 237, 248]. Помимо применения с целью профилактики бруцеллеза у животных, вакцина постоянно используется в качестве эталонной при изучении иммуногенных свойств других противобруцеллезных вакцин.

В целом это первая вакцина *B. abortus*, которая широко использовалась для борьбы с бруцеллезом крупного рогатого скота. В частности, в США эта вакцина использовалась с 1941 года более пятидесяти лет и до сих пор используется в ряде других стран [139, 247, 273]. У телят вакцинация S19 в начале ее применения могла быть выполнена с полной

дозой ( $2,5-12 \times 10^{10}$  колониеобразующих единиц (КОЕ)), оригинальной дозировкой, используемой в классических экспериментах S19, или с уменьшенной дозировкой ( $3-10 \times 10^9$  КОЕ) для минимизации остаточных титров антител и предотвращения случайной персистирующей вакцинальной инфекции [139, 273]. Вакцинация S-19 была протестирована в качестве стратегической в инфицированных стадах с целью сокращения абортов, но была прекращена, поскольку провоцировала аборты у стельных инфицированных животных, главным образом из-за персистенции вакцинальных антител [139, 197, 264].

Широкое применение вакцины из штамма 19 выявило ее основной недостаток, заключающийся в том, что в сыворотке крови иммунизированных юнг животных длительное время сохраняются агглютинины и комплементсвязывающие антитела, выявляемые в реакциях со стандартными антигенами, не позволяющие отличать больных животных от вакцинированных и правильно оценивать эпизоотическую обстановку по бруцеллезу. Поствакцинальные антитела нестабильны и могут полностью выпадать или длительное время сохраняться в диагностических титрах: у взрослых животных (до 2%) — более 1,5–2 лет [16, 17, 39, 94, 147]. По данным других исследователей [3, 42, 107, 137], поствакцинальные антитела выявляются даже через 4–6 и более лет после вакцинации. Некоторые авторы отмечают, что вакцина может вызывать аборты у стельных коров и нетелей [220, 116].

В Россию штамм *B. abortus* 19 был доставлен из США в 1943 году. Первым его свойства начал изучать Юсковец М.К. [158, 160, 161], а впоследствии и другие исследователи [21, 26, 27, 95, 101, 117].

Иммунизация вакциной из штамма *B. abortus* 19 предохраняла животных от естественного заражения, но в стадах с

острым течением бруцеллеза иммунитет мог быть недостаточным [112]. Применение вакцины в различных районах страны позволило значительно снизить распространение болезни и оздоровить многие районы, области и республики от бруцеллеза крупного рогатого скота [15, 16, 17, 20, 31, 38, 88, 90, 95, 103, 104, 107, 120, 165].

На сегодняшний день в Российской Федерации вакцина рекомендована только для однократной иммунизации молодняка крупного рогатого скота в возрасте 3–6 месяцев. Ежегодно этой вакциной иммунизируется около 10 тысяч таких животных.

Вершилова П.А. [21] селекционировала из культуры штамма 19 вариант с пониженной остаточной вирулентностью, названный 19 ВА, из которого изготавливают вакцину против бруцеллеза человека [11, 27, 29].

С 1974 года и по настоящее время в Российской Федерации широко используется вакцина из штамма *B. abortus* 82, разработанная Салмаковым К.М.

Штамм получен в 1961 году путем отбора из популяции колоний исходного штамма, выделенного из abortированного плода коровы совхоза «Татарстан» ТАССР. Он относится к 6-му биовару *B. abortus* и является диссоциантом, агглютинируется S и R антибруцеллезными сыворотками [114, 139, 232, 294].

Некоторые авторы справедливо указывают на abortогеннуюность вакцины из штамма 82, а также сообщают о возможности выделения от иммунизированных животных культуры вакцинного штамма в S-форме [47, 75, 144].

Вакцина использовалась в Советском Союзе с 1974 года для борьбы с бруцеллезом крупного рогатого скота. Иммунизация животных этой слабоагглютиногенной вакциной индуцирует у них уровень защиты, несколько уступающий уровню, формируемому на введен-

ние культуры штамма S19, но вакцина эффективна в полевых условиях [139, 232, 294].

Широкое применение вакцины позволило снизить уровень заболеваемости крупного рогатого скота бруцеллезом в масштабах страны [4, 10, 144]. Однако, несмотря на это, в настоящее время вакцина, как, впрочем, практически все другие живые вакцины, не вполне отвечает требованиям ветеринарной практики.

Для профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота была разработана вакцина из штамма *B. abortus* 104M. Свойства культуры вакцинного штамма были изучены в комиссационных опытах на морских свинках, овцах и крупном рогатом скоте и в производственных условиях в неблагополучных хозяйствах Волгоградской области. При этом установлено, что штамм стабилен, отвечает требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам, имеет маркер, высокоиммуногенен, не мигрирует от привитых животных к не-привитым и менее агглютиногенен, чем штамм *B. abortus* 19 [76, 152], но обладает большей остаточной вирулентностью, чем штамм *B. abortus* 19.

Определенный интерес для практики представляла слабоагглютиногенная вакцина из штамма *B. abortus* 75/79-AB, авторами которой являются Алтайская НИВС и ВГНКИ. Культура вакцинного штамма была выделена из материала отabortировавшей коровы через три года после иммунизации вакциной из штамма *B. abortus* 82. Культура штамма хорошо приживляется в организме животных в сравнительно короткие сроки, расселяясь в генерализованной форме: в течение 60 дней у морских свинок и 30 дней — у телок. Штамм не вызывает в лимфатических узлах и внутренних органах морских свинок патологических изменений, характерных для бруцеллеза, не мигрирует от привитых на непривитых животных.

По результатам исследования сывороток крови в РА и РСК с S-брюцеллезным антигеном телки к 180-му дню после иммунизации вакциной штамма 75/79-AB почти полностью утрачивают агглютинины и комплемент-связывающие антитела. Случаев выделения культуры штамма из молока коров, исследованных в течение 3 месяцев после иммунизации, не зарегистрировано.

Группой профессора Герхардта Шурига в 1982 году из вирулентного гладкого штамма *B. abortus* (*biovar* 1) 2308 путем последовательных пассажей на питательных средах, содержащих субингибирующие концентрации рифампицина или пенициллина, и отбора одиночных колоний в R-форме был получен вакцинный штамм RB51 [296]. Штамм оказался стабильным во время пассажей *in vitro* и *in vivo* и не реверсирует к вирулентному фенотипу [139].

Живая вакцина из штамма *B. abortus* RB51 на сегодняшний день достаточно широко применяется в странах Южной Америки и Азии.

В качестве средства специфической профилактики бруцеллеза мелкого рогатого скота во всем мире известна вакцина из штамма *B. melitensis* Rev-1. Культура штамма была получена Херзбергом и Эльбергом в 1953 г. из вирулентного штамма *B. melitensis* 6056 путём выращивания его на агаре Альбими со стрептомицином. Вначале авторы получили стрептомицинозависимый штамм, но он оказался недостаточно иммуногенным для морских свинок и слабовирулентным для коз. Затем при культивировании штамма на средах с содержанием небольшого количества стрептомицина и без него получили культуру, которая опять приобрела устойчивость к стрептомицину. Новый штамм авторы

называли «стрептомиционезависимым мутантом стрептомицинозависимой популяции» и обозначили его как *B. melitensis* Rev-1.

Первые исследования, проведённые Эльбергом с сотрудниками, показали, что культура штамма *B. melitensis* Rev-1 обладает выраженными иммуногенными свойствами для белых мышей, морских свинок и коз [21]. Вирулентные и иммуногенные свойства вакцины из штамма Rev-1 для морских свинок, коз и овец по рекомендации ВОЗ изучали во многих странах мира — США, Италии, Иране, Алжире, Турции, Монголии, на о. Мальта и др.

Вакцину из штамма *B. melitensis* Rev-1 на крупном рогатом скоте испытали Van Drimmelen G.G., Howell F.D. [308]; Howell F.D., Van Drimmelen G.G. [223]; Шумилов К.В., Акулов А.В. [152]; Церрендаш Ч. [140, 141] и др. Они установили, что вакцина формирует у крупного рогатого скота иммунитет против экспериментального заражения вирулентной культурой *B. abortus* 544 и 54, но не имеет преимущества перед вакцинами из штаммов 19 и 104M, и применение ее на крупном рогатом скоте нецелесообразно.

Основанием для внедрения в практику в нашей стране вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1 явились результаты ее многолетних испытаний. Наибольший вклад в ее изучение внесли Уласевич П.С. и Юсупов О.Ю. В ряде опытов на овцах с использованием живых вакцин из штаммов *B. abortus* 1, 19, 19a, 104M, *B. suis* 61, *B. melitensis* 56 и *B. melitensis* Rev-1 ими было установлено, что самой иммуногенной является вакцина из штамма *B. melitensis* Rev-1 [133, 163]. Опыты по сравнительному изучению вакцин из штаммов *B. abortus* 19 и *B. melitensis* Rev-1, проведенные в ряде стран по рекомендации Всемирной

организации здравоохранения, также показали, что у овец, привитых вакциной из штамма *B. melitensis* Rev-1, формируется более напряженный иммунитет [133].

Во второй половине прошлого века для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота были разработаны и применялись инактивированные адьювант-вакцины: соответственно из штамма *B. abortus* 45/20 (Abortox) и из штамма *B. melitensis* 53H38 (Aborlane).

Штамм 45/20 был селекционирован Mc Even A.D., он является шероховатым мутантом гладкого штамма 45, выделенного в Англии в 1922 году от коровы. Mc Even A.D., Pristley F.W. подвергали штамм последовательным пассажам через организм морских свинок и агар [250, 251, 252, 253]. При проверке культур ряда пассажей (45/6, 45/13, 45/18, 45/20) было установлено, что их вирулентные и иммуногенные свойства усиливаются в зависимости от количества пассажей. Живая вакцина из штамма 45/20 широко применялась в Англии в качестве вакцины № 2, при том что вакциной № 1 являлась вакцина из штамма 19. Однако вскоре стало ясно, что вакцина из штамма 45/20 нестабильна и последующее ее применение может привести к появлению гладких вирулентных мутантов.

Wilson-Taylor A., McDiarmid A.D. провели серию пассажей штамма 45/20 через организм стельных коров, и уже через 3 пассажа штамм возвращался к вирулентной CO<sub>2</sub>-зависимой форме [322]. Ввиду опасности для человека и животных применение живой вакцины, изготовленной из культуры штамма, было запрещено.

Вакцина из штамма 45/20, комбинированная с масляным адьювантом, изготавливалась из убитой нагреванием культуры *B. abortus*

(биовар 1) штамма 45/20 [139, 255]. Вакцинный штамм был из гладкого штамма 45/20 после 20 пассажей через морских свинок [139, 254]. Этот препарат использовался в некоторых странах Европейского союза с целью решения проблемы поствакцинальных антител, синтезируемых у животных вакцинами из штамма S19, и был успешно апробирован в Российской Федерации [139, 265].

Штамм *B. melitensis* 53Н38 был выделен Кастанедой Р. в Мексике от человека [109]. Штамм высоковирулентен и используется для экспериментального заражения мелкого рогатого скота при проверке иммуногенных свойств противобруцеллезных вакцин.

Renoux G. [109] предложил для практического применения вакцину Aborlane, состоящую из водной суспензии убитой 0,65%-ным формалином культуры *B. melitensis* 53Н38, находящейся в S-форме в масляном адьюванте WL67413 с содержанием в 1 мл вакцины 150 млрд микробных клеток. Вакцина Renoux G. постоянно давала хорошие результаты на мышах и морских свинках [109, 179, 262, 287].

Адьювант-вакцины из штаммов *B. abortus* 45/20 Abortox и *B. melitensis* 53Н38 Aborlane были широко апробированы в Российской Федерации [63, 66, 67, 155].

В ФГБУ «ВГНИИ» с учетом положительных результатов апробации вакцины из штамма *B. abortus* 45/20 Abortox была сконструирована инактивированная адьювант-вакцина из штамма *B. abortus* КВ 17/100, полученного путем целенаправленной селекции вакцинного штамма *B. abortus* 104М. Последний отличается от исходного пониженной остаточной вирулентностью, не вызывает у привитых животных синтез S-антител. Многократные

пассажи штамма КВ 17/100 через организм морских свинок и поддержание на питательных средах в течение 10 лет показали высокую стабильность его биологических свойств.

В производственных условиях в хозяйствах Саратовской области были изучены реактогенные, антигенные и сенсибилизирующие свойства адьювант-вакцины и ее профилактическая эффективность [14, 59, 60, 61, 153, 154, 155]. При этом была установлена ее высокая эффективность при оздоровлении неблагополучного по бруцеллезу крупного рогатого скота стада хозяйства. Отсутствие поствакцинальных реакций с S-брucеллезным антигеном обеспечивает возможность проведения серологических исследований на бруцеллез независимо от сроков вакцинации, что, по мнению авторов, способствует быстрому оздоровлению хозяйств, неблагополучных по данной инфекции. Прекращение применения вакцины было обусловлено ее поствакцинальной реактогенностью, проявляющейся в формировании в месте введения вакцины в области кожной складки подгрудка весьма выраженной контурированной припухлости (депо). Следует отметить, что абсцедирования указанных припухостей практически не наблюдалось.

В СССР разработкой, испытанием и внедрением в практику бруцеллезных вакцин начали заниматься в 20-х годах прошлого столетия [122]. За прошедший период времени было селекционировано более 50 штаммов бруцелл и апробировано более 30 вакцин. Перечень наиболее изученных, в том числе широко апробированных, а также внедренных в практику вакцинных штаммов (вакцин) и применяющихся продолжительное время, представлен в табл. 3.

**Таблица 3. Наиболее изученные в Российской Федерации вакциные штаммы бруцелл и бруцеллезные вакцины**

Наименование штамма	Год внедрения	Авторы	Вид животных	Внедрены в практику
<i>B. abortus</i> 19	1952	J.M. Buck	крупный рогатый скот (КРС), овцы	+
<i>B. melitensis</i> Rev-1	1974 [1953]	S. Elberg, M. Herzberg	овцы, козы	+
<i>B. abortus</i> 104 М	1970	К.В. Шумилов, X.С. Котлярова	КРС, овцы	+
<i>B. abortus</i> 82	1960	К.М. Салмаков	КРС	+
<i>B. abortus</i> 75/79-AB	1996	К.В. Шумилов, И.П. Никифоров и др.	КРС	+
<i>B. abortus</i> 45/20	1922	A.D. McEwen	КРС	+
<i>B. melitensis</i> 53H38		G. Renoux	КРС, МРС	+
<i>B. abortus</i> KB 17/100	1997	К.В. Шумилов, В.В. Калмыков	КРС	+
<i>B. abortus</i> 21	1960	В.С. Рягузов	КРС	-
<i>B. abortus</i> 8	1955	П.Н. Жованник	КРС	-
<i>B. abortus</i> B-8	1955	П.Н. Жованник	КРС	-
<i>B. abortus</i> 7/26	1980	П.Н. Жованник	КРС	-
<i>B. abortus</i> 519	1966	И.А. Косилов	КРС	-
<i>B. abortus</i> 82 ПЧ	1979	К.М. Салмаков Г.А. Белозерова	КРС	-
<i>B. abortus</i> B-1	1948	Е.С. Орлов	КРС	-
<i>B. abortus</i> 4004/1	1962	Е.С. Орлов	КРС	-
<i>B. abortus</i> 16/4	1967–1971	П.А. Триленко	КРС	-
<i>B. abortus</i> 70		К.П. Студенцов	КРС	-
<i>B. melitensis</i> 56		Е.С. Орлов, А.А. Клочков	КРС	-
<i>B. melitensis</i> K-24	1971	П.А. Триленко	овцы, козы	-
<i>B. melitensis</i> «Невский 12»	1959	И.Н. Невский, М.С. Абдужанов	КРС	-
<i>B. melitensis</i> «Невский 13»	1980	Р.Г. Яраев, К.В. Шумилов и др.	КРС	-
<i>B. melitensis</i> 89/23	1964	Л.В. Кириллов	МРС	-
<i>B. suis</i> 61		М.К. Юсковец	КРС	-

Данные о специфической профилактике бруцеллеза животных в Российской Федерации за последние 10 лет представлены в табл. 4.

В целом можно утверждать, что вакцины против бруцеллеза, вызываемого *B. abortus*, в первую очередь против абортофагов, играют центральную роль в про-

**Таблица 4. Специфическая профилактика бруцеллеза животных в Российской Федерации в период с 2010 по 2019 гг.**

Вакцина из штамма	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Крупный рогатый скот, тыс. гол.										
<i>B. abortus</i> 82	1722,3	1608,5	1669,5	1740,7	1915,3	1692,5	1400,8	1261,3	1644,3	1612,4
<i>B. abortus</i> 75/79-AB	134,59	111,3	91,258	74,4	110,1	108,4	117,4	89,0	81,6	81,6
<i>B. abortus</i> 19	12,5	11,2	13,4	11,5	12,8	11,1	8,2	5,5	8,0	8,1
Мелкий рогатый скот, тыс. гол.										
<i>B. melitensis</i> Rev-1	3959,0	3153,0	3510,5	4626,7	3921,2	1879,2	3439,0	2057,8	3352,3	3352,3
<i>B. abortus</i> 19	1694,5	1662,3	1572,1	1650,1	1478,0	1393,1	1318,3	944,3	1180,0	1227,7

граммах борьбы с бруцеллезом крупного рогатого скота и успешно используются во всем мире на протяжении десятилетий. Однако из-за некоторых недостатков, присущих этим вакцинам, было предпринято много усилий для разработки новых вакцин, более безопасных и эффективных, которые также могли бы быть использованы у других восприимчивых видов животных.

В то же время, согласно Schurig et al. [139, 295], идеальная вакцина против бруцеллеза должна обладать следующими характеристиками: 1) быть живой и способной обеспечить выраженный Т-хелперный иммунный ответ типа 1 [Th1]; 2) не индуцировать антитела, которые мешают серологическим тестам, используемым при диагностике инфицированного крупного рогатого скота, независимо от маршрута, дозы введения, возраста или пола животных; 3) быть ослабленной и не вызывать заболевания или персистирующей инфекции у иммунизированных животных и не быть патогенной для человека; 4) быть способной индуцировать сильную и длительную защиту от системных и маточных инфекций, помимо предотвращения абортов, даже у беременных животных, привитых однократной дозой; 5) не приводить к сероконверсии при ревакцинации; 6) быть стабильной и не возвращать вирулентность *in vivo* или *in vitro*; и 7) быть недорогим, простым в производстве и применении препаратом.

Однако по состоянию на сегодняшний день ни одна из существующих вакцин не соответствует указанным критериям [139].

Несмотря на это, вакцинация доступными вакцинными штаммами остается наиболее успешным методом профилактики и борьбы с бруцеллезом крупного рогатого скота, являясь важнейшим компонентом большинства программ борьбы с бруцеллезом и его искоренения во всем мире. Вакцины против бру-

целлеза были оценены с точки зрения их эффективности тремя различными подходами: 1) тестирование на лабораторных животных или 2) тестирование на естественных хозяевах, испытанных экспериментально и 3) тестирование в естественных условиях [264]. Из них тест на естественных хозяевах показывает более значительный ответ и является единственным, способным измерить эффективность *B. abortus*-вакцины.

В экспериментальных исследованиях эффективности вакцины вакцинированные и невакцинированные контрольные группы получают известную инфекционную дозу вирулентного штамма *B. abortus* в наиболее восприимчивый период (середина беременности), а защита измеряется способностью вакцины предотвращать аборты. Однако важно учитывать, что экспериментально полученная эффективность может отличаться от полевой эффективности, на которую могут влиять другие факторы, такие как кормление, экологический стресс, возраст при вакцинации, способ и место введения вакцинации или иммунологический статус животных.

В силу этого оценка качества живых бруцеллезных вакцин обычно основывается на критериях тестов *in vitro*, включая физико-химические и микробиологические тесты на чистоту, диссоциацию, определение pH, влажности и количества жизнеспособных бактерий [257]. В последнее время генетическая стабильность также была предложена в качестве дополнительного критерия оценки качества *Brucella spp.* вакцины [139].

Наилучшие результаты в профилактике бруцеллеза крупного рогатого скота продемонстрировали вакцины из аттенуированных штаммов *B. abortus* [139, 273].

В мире известно только несколько вакцин, которые были использованы при массовой иммунизации крупного рогатого скота против *B. abortus* — S19, RB51,

45/20 и SR82 [139]. Однако в странах, стандартно неблагополучных, в которых имеются территории, эндемичные по бруцеллезу, искоренить болезнь затруднительно, в связи с чем разработка эффективных бруцеллезных вакцин является актуальной и на сегодняшний день.

Помимо клеточных живых или инактивированных вакцин предложено и испытано много проектов вакцин против *B. abortus*, включая ДНК, субъединичные, рекомбинантные *B. abortus* и рекомбинантные векторные вакцины. Все они оценивались главным образом в опыте на мышах [139, 167, 168, 169, 172, 186, 201, 218, 219, 221, 224, 233, 236, 241, 246, 256, 269, 270, 271, 274, 277, 278, 293, 298, 299, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 324, 325, 326, 328] и практически не были испытаны на крупном рогатом скоте или не были эффективными для него.

Многочисленные достижения в области геномики, протеомики, технологии рекомбинантных ДНК и даже в области вакцинологии побудили проведение исследований по созданию вакцин без недостатков, характерных для живых препаратов. В итоге были выполнены исследования по разработке, проверке эффективности или оценке иммунологических реакций к *B. abortus* генно-инженерных вакцин с использованием рекомбинантных генов, белков, векторов и модифицированных штаммов, в основном на мышах. Однако, за некоторыми исключениями, большинство этих рекомбинантных вакцин не были протестираны или не защищали крупный рогатый скот. Кроме того, важно учитывать, что рекомбинантные вакцины, особенно неживые, имеют ограничения в отношении экономической жизнеспособности, необходимости многократных иммунизаций и комбинирования антигенов [139].

**ДНК-вакцины.** ДНК-вакцины дают возможность индуцировать как кле-

точные, так и гуморальные реакции, экспрессия антигенов пролонгирована, они обладают лучшей стабильностью и не требуют охлаждения при хранении. Поэтому было исследовано несколько антигенов в качестве ДНК-вакцин против *B. abortus-challenge*, обеспечивающих различные уровни защиты. Однако, несмотря на то, что некоторые показали очень многообещающие результаты на мышах, по крайней мере после четырех бустерных вакцинаций, высокая стоимость использования у крупных животных делает этот тип вакцины не-практичным для крупного рогатого скота, основной цели вакцинации против бруцеллеза. Более того, за исключением исследований на мышах практически ни одна ДНК-вакцина не была исследована в естественных хозяевах [139, 208].

**Субъединичные вакцины.** Многие из антигенов, протестированных в качестве ДНК-вакцин, также были оценены как потенциальные антигены для субъединиц вакцин (L7/L12 рибосомный белок; P39; BLS; Omp16; Cu/Zn SOD) [167, 270, 277, 298, 310]. Белки наружной мембранны (Omp) *B. abortus*, потенциальные иммуногенные антигены, широко изучались в качестве субъединиц вакцин [218, 241, 277, 278]. Нелипидированные рекомбинантные Omp16 и Omp19, а также инкапсулированная рекомбинантная липосома Omp25 давали защиту, сравнимую с S19 у вакцинированных мышей после заражения [218, 277, 278]. Кроме того, субъединица вакцины Omp28 повышала устойчивость к вызову вирулентного *B. abortus*, но на более низком уровне, чем живые адьюнированные вакцины [139].

Потенциальное применение субъединичных вакцин *B. abortus* в полевых условиях весьма ограничено, хотя и были получены некоторые обнадеживающие результаты. Потребность в каких-то промоторах, адьювантах и ком-

бинации нескольких антигенов пока делает их экономически непригодным для крупного рогатого скота. Кроме того, важно учитывать, что реакция, наблюдалась у мышей, может не отражать защиту, достигнутую у естественных хозяев после вакцинации [139].

**Векторные вакцины.** В качестве альтернативы гены, кодирующие иммунодоминантные антигены *B. abortus*, могут быть введены в аттенуированные вирусы или бактерии, которые служат векторными вакцинами. Гены *B. abortus* были успешно экспрессированы в вирусах (вирус леса Семлики и вирус оспо-вакцины) и бактериях (*Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi*, *Lactococcus lactis*, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Typhimurium* и *B. abortus*) [139, 169, 172, 186, 221, 275, 293, 312, 328]. *Escherichia coli*, *O. anthropi* (плюс неметилированные CpG-мотивы) и *L. lactis*, экспрессирующие Cu/Zn СОД-антиген *B. abortus*, были способны вызывать иммунный ответ Th1 и защищать мышей после заражения вирулентным *B. abortus* [139]. Однако недостатки, наблюдаемые в случае применения неживых вакцин, такие как необходимость многократного введения иммунизирующих доз, использование адьювантов, использование при их конструировании других микроорганизмов, или экспрессирующих белков *B. abortus*, и высокая стоимость, свидетельствуют, что они еще нуждаются в идеальной группировке антигенов, оптимизации количества, чтобы быть эффективными.

**Другие потенциальные вакцины против *B. abortus*.** Помимо рекомбинантных вакцин *B. abortus*, в качестве бесклеточной альтернативы живым вакцинам были использованы также вакцины на основе везикул наружной мембранны (OMB) [170]. ОМВ — это бислойные мембранные везикулы, высвобождаемые грамотрицательными и грамположительными бактериями, которые

были связаны со многими процессами, такими как высвобождение вирулентных факторов, перенос ДНК, регуляция иммунного ответа хозяина и выживание в клетке-хозяине [139].

В целом вакцинация является определяющей в стратегии программ борьбы с бруцеллезом и его искоренения, поэтому она была и остается объектом многочисленных исследований на протяжении десятилетий. Определение иммунных маркеров, коррелирующих с защитой, путем математического моделирования или оценки иммунного ответа в исследованиях вакцин — вызовов — было бы очень полезно при скрининге вакцин-кандидатов *B. abortus*.

## Литература

1. Абиджанов М.С. Сравнительное изучение иммуногенных свойств штаммов Невский 12 и Вр. *abortus* 19. Материалы докладов Всесоюзной конф., посвященной 90-летию Казанского ветеринарного ин-та. Казань, 1963; 59–60.
2. Авилов В.М., Селиверстов В.В., Пылинин В.Ф. и др. Бруцеллез животных и его специфическая профилактика. Ветеринария. 1997; 7: 3–13.
3. Акачурин Б.С. Изучение эпизоотологического значения крупного рогатого скота, длительно сохраняющего поствакцинальные реакции (РА и РСК). Тр. ВИЭВ/ 1967; 33: 167–194.
4. Алексеев К.К., Локин А.К., Жуков П.Ф. Значение специфической профилактики в комплексе противобруцеллезных мероприятий. Сб. науч. тр. Каз. ВИ. 1980; 136: 82–84.
5. Аливердиев А.А. Реакция длительного связывания комплемента. О бруцеллезе сельскохозяйственных животных и о мерах борьбы с ним. Махачкала, 1960; 35–42.

6. Антонов Б.И., Шумилов К.В., Скляров О.Д. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) с ОПС антителом ИЭВСиДВ при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота. Ветеринария. 1994; 8: 19–21.
7. Аракелян П.К., Димов С.К. Диагностическая эффективность роз-бенгал пробы (РБП) при бруцеллезе яков. Туберкулез и бруцеллез сельскохозяйственных животных. Науч.-техн. бюлл. СО ВАСХНИЛ ИЭВСиДВ. Новосибирск. 1984; 30: 41–44.
8. Бабкин А.Ф., Орлова В.А., Ивановская Л.Б. Применение роз-бенгал пробы на животных, зараженных вакцинацией и вирулентными штаммами бруцелл. Ветеринария. Киев, 1984; 59: 5–7.
9. Бажин М.А. Особенности первичного и вторичного иммунных ответов в связи с возрастом телят и дозой бруцелл. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Троицкий вет. ин-т. Троицк, 1974; 21.
10. Базалей Ф.К., Евтенко Л.Т., Евстафиади К.М. Результаты применения противобруцеллезной вакцины из слабо агглютиногенного штамма 82 на крупном рогатом скоте. Сб. науч. тр. КазВИ. 1980; 135: 84–90.
11. Баландин Г.А., Сазыкин С.П. О постvakцинальной патергии при бруцеллезе. Сообщение I. ЖМЭИ. 1963; 8: 44–49.
12. Бельченко В.Б., Рождественская Н.А. Итоги производственного испытания вакцины из штамма 82 в хозяйствах Карагандинской области. Совершенствование ветмероприятий в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных в Казахстане. Алма-Ата. 1981(1982); 62–73.
13. Бобылев А.Н., Калмыков В.В. Профилактическая эффективность иммунизации крупного рогатого скота из штамма Бруцелла абортус КВ 17/100 в Калининском районе Саратовской области. Научные основы производства ветеринарных препаратов. Тез. докл. Всероссийской науч.-практической конф., посв. 30-летию ВНИИТИБП. Щелково. 2000; 155–157.
14. Бобылев А.Н., Калмыков В.В. Профилактическая эффективность иммунизации крупного рогатого скота из штамма Бруцелла абортус КВ 17/100 в Калининском районе Саратовской области. Научные основы производства ветеринарных препаратов. Тез. докл. Всероссийской науч.-практической конф., посв. 30-летию ВНИИТИБП. Щелково. 2000; 155–157.
15. Божко Г.К. Опыт применения вакцины из штамма 19 в Украинской ССР. Ветеринария. 1958; 10: 23–24.
16. Бойко А.Т. Опыт вакцинации против бруцеллеза вакциной из штамма № 19. Ветеринария. 1957; 8: 55–56.
17. Ваненков М.В. Эффективность противобруцеллезных мероприятий с применением вакцины из штамма № 19. Матер. Межвед. конф. по борьбе с бруцеллезом. Кавсельхозгиз. 1963; 14: 136–139.
18. Вашкевич Р.Б. Изучение остаточной контагиозности вакцинного штамма 82 у северных оленей // Инфекционные болезни сельскохозяйственных животных в Сибири и на Дальнем Востоке. Новосибирск. 1982; 10: 29–31.
19. Вениаминсон С.Г. О специфичности РА при исследовании на бруцеллез крупного рогатого скота. Ветеринария. 1954; 12: 17.
20. Вертелецкий Л.Л. Ликвидация бруцеллеза крупного рогатого скота в областях, краях и автономных республиках Российской Федерации. Матер. междунар. конф. МЭБ. 1965; 33–39.
21. Вершилова П.А. [под ред.]. Бруцеллез. М.: Медицина, 1972; 439.
22. Вершилова П.А., Голубева А.А. Бруцеллез. 2-е изд. М.: Медицина, 1972; 439.
23. Вершилова П.А., Драновская Е.А., Самойленко И.И. Бруцеллезная

- химическая вакцина пролонгированного защитного действия. Материалы 1-й Всесоюзной конференции: Теоретическая и прикладная инфекционная иммунология. М., 1982; 58.
24. Вершилова П.А. Изучение полисахаридно-липоидного антигена из группы В. Бруцелла. Архив биологических наук. 1941; 63(1–2): 39–99.
25. Вершилова П.А. Иммуногенные свойства штамма *B. abortus* 19 в опытах на морских свинках и на людях. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1947; 23(6): 29–33.
26. Вершилова П.А. Опыт иммунизации морских свинок и белых мышей против бруцеллеза ацирulentной культурой бруцелл и полисахаридно-липоидным комплексом. ЖМЭИ. 1947; 7: 17–21.
27. Вершилова П.А., Кокорин И.Н. Течение бруцеллезной инфекции в иммунном организме. ЖМЭИ. 1954; 1: 27–31.
28. Вершилова П.А., Асланян Р.Г. Эпидемиологическое значение природных очагов бруцеллеза. Вестн. АМН СССР. 1980; 10: 67–71.
29. Вершилова П.А., Кокорин И.Н. Морфологическая и бактериологическая характеристика вакцинного процесса при бруцеллезе. ЖМЭИ. 1964; 1: 7–13.
30. Волкова А.А. Сравнительная оценка РА молока, как метод диагностики бруцеллеза. УзНИВОС. 1938; 9: 25–32.
31. Волосков И.А. Из опыта применения вакцины из штамма 19 в колхозах. Ветеринария. 1968; 10: 36.
32. Вышелесский С.Н. Научная оценка современных мер борьбы с бруцеллезом сельскохозяйственных животных. Труды 34-го пленума ветеринарной секции. М., 1955: 5–17.
33. Галиев А.Р., Ким В.И., Шумилов К.В. Усовершенствование постановки роз-бенгал пробы (РБП) при исследовании сыворотки крови на бруцеллез. Инфекционные болезни животных и вопросы природной очаговости. Фрунзе, 1984; 10: 86–88.
34. Гаранина С.Б. Адаптация основанного на ПЦР метода для детекции бруцелл при работе с биологическими образцами и объектами внешней среды. Генетика. 1996; 30: 30.
35. Георгиев Г.П. Международный симпозиум по бруцеллезу. Рабат. Марокко. Ветеринарно-медицинские науки. 1967; 13: 107–109.
36. Говоров О.В. Выделение бруцелл с молоком у коров бруцеллезных групп. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Науч. тр. ЦНИЭВ. 1937; 8: 52.
37. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. С.-Пб.: Специальная литература, 1997; 287.
38. Григоренко Н.П. Борьба с бруцеллезом в свеклосовхозах Алтая. Ветеринария. 1957; 6: 57.
39. Гринин А.С., Новицкий А.А. Динамика иммунобиологических реакций у крупного рогатого скота после прививки вакциной из штамма №19. Сб. науч. раб. СибНИВИ. 1966; 14: 198–202.
40. Гринько В.К., Назарова С.А., Яраев Р.Г. и др. Изучение эффективности иммунизации крупного рогатого скота вакциной из штамма 19 в малой дозе. Актуальные проблемы ветеринарной науки и практики. Тезисы науч.-производственной конф. Самарканд. 1987; 15–16.
41. Давыдов Н.Н. Пластинчатая реакция агглютинации с антигеном роз-бенгал у северных оленей при диагностике бруцеллеза. Инфекционные и инвазивные болезни животных Якутии. Науч.-тех. бюлл. СО. Новосибирск. 1982; 9: 13–14.
42. Данынев И.А., Ростов А.П. Эпизоотическое значение животных в отдаленные сроки после прививок вакцины из штамма № 19. Ветеринария. 1975; 7: 46–60.

43. Дегтяренко Л.В. Некоторые аспекты диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным. Тез. докл. Всесоюз. конф. Новосибирск. 1987; 122–123.
44. Дегтяренко Л.В., Кондауров Б.И. Получение и испытание бруцеллезного антигена, окрашенного розовым бенгальским для пластинчатой реакции агглютинации. Сб. науч. работ СибНИВИ. Новосибирск. 1978; 32: 28.
45. Дорофеев К.А., Путимов В.М. Изучение сухой бруцеллезной вакцины из штамма 19 на крупном рогатом скоте. Ветеринария. 1943; 4: 30–31.
46. Драновская Е.А., Игнатов П.Е. Изучение синтетических полимеров в качестве стимуляторов и пролонгаторов иммунного действия бруцеллезного протективного антигена. Микробиология, эпидемиология и иммунология. 1982; 3: 69–73.
47. Дуранов В.С. Свойства бруцелл, выделенных из abortированных плодов коров, привитых вакциной из штамма 82. Ветеринария. 1975; 11: 32–33.
48. Желудков М.М. К вопросу об антигенном родстве возбудителя бруцеллеза и иерсиния энтероколитика сероварианта 0:9. Современные проблемы зоонозных инфекций. Тезисы докладов Всесоюзной межведомственной конф. М., 1981; 98–99.
49. Желудков М.М., Павлова И.П., Шаханина К.Л. и др. Определение специфических антител иммуноферментным методом при бруцеллезе у людей. Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. Тезисы Всесоюз. науч. конф. Иркутск. 1984; 2: 102–103.
50. Жованик П.Н., Демченко А.В., Божко Г.К., Коротич А.С. Бруцеллез. Киев: Урожай, 1975; 224.
51. Здродовский П.Ф. Очерк современного учения о бруцеллезе примени- тельно к патологии человека. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. М., 1934; 10–44.
52. Иванов М.М., Малахова Т.И., Нязов У.Э. и др. Итоги изучения вакцинных штаммов бруцелл. Сб. тр. ВГНКИ. М., 1977; 23: 92–103.
53. Иванов М.М. и др. Оценка эффективности противобруцеллезных вакцин из штаммов 82, 89/23, Н-12 и Рев-1. Ветеринария. 1971; 7: 32–34.
54. Иванов Н.П. Бруцеллез животных: методы и средства борьбы с ним. Алма-аты, 2002; 367.
55. Иванов Н.П., Белобаб В.И., Сарсенов М., Рабочая Л.М. Сравнительная оценка показаний РСК (РДСК) при исследовании сывороток крови животных с применением антигенов, приготовленных из культуры бруцелл, с различными по степени диссоциации популяциями. Совершенствование ветеринарных мероприятий в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных в Казахстане. Сб. науч. тр. Алма-Ата. 1981; 78–86.
56. Иммуноферментный анализ. Нго Т. и Ленхоффа Г. (ред.). М.: Мир, 1988; 446.
57. Иоффе В.И. Итоги работ по серологическому анализу некоторых экспериментальных инфекций и очередные задачи дальнейших исследований. ЖМЭИ. 1940; 11: 13.
58. Какоулин Т.Е., Сазонов Ю.И. Изучение реактогенных и иммуногенных свойств некоторых противобруцеллезных вакцин (сообщение 1). Сб. тр. Иркутской НИВС. Иркутск. 1976; 3: 106–108.
59. Калмыков В.В. Масляные адьюванты для неиннагглютиногенных вакцин против бруцеллеза крупного рогатого скота. Всерос. научно-прак. конф. ВНИИТИБП. Щелково. 2000; 148–150.
60. Калмыков В.В. Бобылев А.Н. Профилактическая эффективность

- иммунизации крупного рогатого скота адьювант-вакциной из штамма Бруцелла abortus KB 17/100. Матер. междунар. научн. конф. Казанская гос. академия вет. мед. им. Н.Э. Баумана. 2000; 29: 69–70.
61. Калмыков В.В. Экспериментальные адьювант-вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота. Всерос. научно-прак. конф. ВНИИТИБП. Щелково. 2000; 150–152.
62. Кассал Е.Ю., Панкратова Е.В. Экономическая оценка учащенного применения вакцинопрофилактики в комплексе противобруцеллезных мероприятий. Бруцеллез сельскохозяйственных животных: Сб. тр. ВАСХНИЛ. ВНИИБТЖ. Омск. 1989; 4–11.
63. Касымов Т.К. Результаты сравнительного изучения реактогенных свойств противобруцеллезных вакцин из штаммов 53Н38, 45/20, 104М, и Rev-1 на баранах-производителях. Сб. науч. тр. ВГНКИ. 1985; 71–75.
64. Касьянов А.Н., Маматова З.Б., Ромахов В.А., Лим А.А. Выявление антител в крови иммунизированных против бруцеллеза телок. Ветеринария. 1986; 7: 29–31.
65. Касьянов А.Н., Ромахов В.А. Результаты изучения эпизоотологии, диагностики и спецпрофилактики инфекционного эпидидимита баранов. Состояние и перспективы научных исследований по диагностике и профилактике туберкулеза и бруцеллеза и мерам борьбы с этими болезнями с.-х. животных. Омск, 1980; 290–292.
66. Касьянова Л.Ф. Антигенные, аллергенные и иммуногенные свойства адьювант-вакцин из штаммов *B. abortus* 45/20 и *B. melitensis* 53Н38 на морских свинках и телках. Сб. науч. тр. ВГНКИ. 1985; 24–26.
67. Касьянова Л.Ф. Результаты сравнительного изучения реактогенных и иммуногенных свойств адьювант-вакцин из штаммов *B. abortus* 45/20 и *B. melitensis* 53Н38 на морских свинках и телках. Сб. науч. тр. ВГНКИ. 1985; 67–71.
68. Ким В.И., Беляков А.И. и др. Результаты испытания вакцины из штамма 19 в малой дозе (3 млрд м.кл.) в Киргизской ССР. Инфекционные болезни животных и вопросы природной очаговости. Сб. тр. академии наук Киргизской ССР, ин-т биохимии и физиологии. Фрунзе, 1985; V: 15–18.
69. Клименко В.А. Диагностическое значение кольцевой реакции при исследовании коров, иммунизированных вакциной из штамма 82. Инфекционные и незаразные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане. Сб. науч. тр. Алма-Ата. 1983; 66–70.
70. Клочков А.А., Шумилов К.В., Ромахов В.А., Альбертян М.П. Изучение свойств вакцинного штамма 104М, пассивированного через организм нетелей и морских свинок. Бюлл. ВИЭВ. 1981; 43: 47–50.
71. Клочков А.А. Изучение свойств диссоциированных слабоагглютиногенных штаммов бруцелл. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. ВИЭВ. М., 1987; 21.
72. Кобец М.С. О кольцевой реакции с антигеном ЛенНИВИ при диагностике бруцеллеза у крупного рогатого скота. Ветеринария. 1959; 8: 54.
73. Косилов И.А. Биологические свойства вакцины из штамма 82 в эксперименте и производственных условиях. Косилов И.А. Сб. науч. тр. ИЭВ-СиДВ. Новосибирск. 1978; 2: 7–12.
74. Косилов И.А., Димов С.К., Джупина С.И. Оптимизация системы мер борьбы с бруцеллезом крупного рогатого скота. Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения. Материалы 3-й респуб. научно-практической конф. Гродно. 1987; 98.
75. Косилов И.А., Ощепков В.Г., Шадрина М.Н. Биологические свой-

- ства вакцины из штамма *B. abortus* 82 в эксперименте и производственных условиях. Научн. труды Сиб. отд. ВАСХНИЛ. Новосибирск. 1978; 54–59.
76. Косилов И.А., Попов А.И., Байганинов Ш.А. Некоторые результаты применения вакцины из штамма Б. абортус 104-М телятам в производственных условиях. Сб. науч. раб. СибНИВИ. 1975; 22: 18–22.
77. Кошурин А.И. Работа Сибирского НИВИ по проблеме бруцеллеза. Сб. науч. тр. СибНИВИ. Омск. 1966; 14: 3–21.
78. Ковалев Д.А., Мисетова Е.Н., Головнева С.И., Ляпустина Л.В. Использование multiple locus variable tandem repeats analysis в систематике возбудителя бруцеллеза. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012; 2: 30–34.
79. Лазарев Н.П. Кольцевая реакция с молоком и сывороткой крови при диагностике. Сов. ветеринария. 1968; 4: 98.
80. Лебедева Е.Г., Лившиц А.А. Диагностическая ценность кольцевой реакции с цветным антигеном в определении зараженности бруцеллезом. ЖМЭИ. 1954; 11: 68–70.
81. Лим А.А., Касьянов А.Н., Искандеров М.И. Динамика иммуноглобулинов М и С в зависимости от метода введения противобруцеллезной вакцины. Сб. тр. ВИЭВ. М., 1987; 64: 74–78.
82. Лим А.А. Иммунологическая реактивность крупного рогатого скота в зависимости от метода введения вакцины из штамма *B. abortus* 104M. Бюллетень ВИЭВ. М., 1985 (1986); 59: 5–7.
83. Лим А.А. Эффективность конъюнктивальной иммунизации крупного рогатого скота против бруцеллеза. Доклады ВАСХНИЛ. 1988; 3: 44–46.
84. Логинов Ф.С. К вопросу применения кольцевой реакции с цельным молоком для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота. Ветеринария. 1956; 2: 37.
85. Локтева Ф.П. Испытание противобруцеллезной формолквасцовой вакцины против бруцеллеза. Ветеринария. 1946; 7: 20–21.
86. Локтева Ф.П. Оздоровление с.-х. животных от бруцеллеза на территории района. Ростовская вет. опытная станция. Труды. Ростов н/Д. 1940; 8: 137–149.
87. Локтева Ф.П., Беляева Н.П. Результаты сравнительного испытания РА с 12-процентным раствором хлористого натрия, РА с физраствором и РСК при бруцеллезе крупного рогатого скота. Тр. Ростовской обл. науч. — исслед. ветеринарной станции. 1968; 1(XII): 40–41.
88. Львов А.Я. Результаты прививок крупного рогатого скота вакциной из штамма № 19. Матер. межвед. конф. по борьбе с бруцеллезом. Алма-Ата. 1963; 126–128.
89. Масевич П.С., Касьянов А.Н., Малахова Т.И. и др. Результаты испытания роз-бенгал пробы при диагностике бруцеллеза животных. Проблемы профилактики и борьбы с туберкулезом и бруцеллезом животных. Бюлл. Всесоюз. НИИ эксп. ветеринарии. М., 1981; 43: 42–46.
90. Махмудов А.М. Противобруцеллезные прививки сельскохозяйственных животных вакциной из штамма № 19. Мат-лы межвед. конф. по борьбе с бруцеллезом. Алма-Ата. 1963; 123–125.
91. Мельниченко Л.П., Шумилов К.В. Изучение антигенных связей S- и R-форм Иерсиния энтероколитика серовара 09 с Бруцелла абортус 19. Сб. науч. трудов ВГНКИ. М., 1995; 57: 207–215.
92. Меринов С.П., Заноснина Т.Ю., Голубицкий Е.П. Иммуноферментный метод обнаружения антигенов бруцелл и антител к ним. Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. Тез. докл. Всесоюзной науч. конф. Иркутск. 1984; 2: 11–13.

93. Минжасов К.И., Антюхов В.М. Изыскание оптимальных доз вакцин для иммунизации крупного рогатого скота против бруцеллеза // Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным. М., 1989; 165–167.
94. Морякова О.И., Заседателева Г.С. Изучение иммунобиологических реакций у крупного рогатого скота, вакцинированного штаммом 19 в различных эпизоотических условиях. Тр. ВИЭВ. 1962; 24: 90–97.
95. Морякова О.И. Изучение поствакцинальных реакций у крупного рогатого скота, привитого против бруцеллеза вакциной из штамма 19. Тр. ВИЭВ. 1967; 20: 23–34.
96. Морякова О.И. Кольцевая реакция с молоком при диагностике бруцеллеза у коров. Тр. ВИЭВ. М., 1961; 24: 124. 112.
97. Николаев В.А. Оздоровление неблагополучных по бруцеллезу (туберкулезу) ферм и хозяйств-изолятаторов путем полной замены поголовья выращенным здоровым // Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Ленинград. 1950; 219–221.
98. Новицкий А.А., Красиков А.П., Понкратов С.А. и др. Иммунологический ответ организма телок на введение различных доз противобруцеллезных вакцин из штаммов 82, 19 и 104М // Методы диагностики и профилактики бруцеллеза и туберкулеза животных. Омск. 1988; 17–26.
99. Новицкий А.А. Оптимизация специальных мероприятий против бруцеллеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Казань, 1989; 46.
100. Орлов Е.С., Корнеева В.А., Морякова О.И., Чернышева М.И. Изучение живой вакцины из штамма 19. Ветеринария. 1946; 7: 18–20.
101. Орлов Е.С., Карнеева В.Е., Морякова О.И. Изучение живой вакцины из штамма № 19. Ветеринария. 1946; 7: 18–19.
102. Орлов Е.С., Данышев И.А., Клочков А.А. К производственной проверке штамма *Br. abortus* B-I при бруцеллезе крупного рогатого скота. Сб. тр. Саратовской НИВС. Саратов. 1967; 7: 26–31.
103. Орлов Е.С. О достижениях в области изучения бруцеллеза животных. Тр. ВИЭВ. 1969; 23: 257–275.
104. Орлов Е.С. Результативность применения специфических средств профилактики при бруцеллезе и их совершенствование. Бруцеллез и туберкулез сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1967; 121–155.
105. Орлов Е.С., Клочков А.А. Результаты изучения слабоагглютиногенной культуры штамма *B. abortus* 4004/I. Сб. тр. ВИЭВ. М., 1967; 33: 161–167.
106. Орлов Е.С., Уласевич П.С., Борисович Ю.Ф. Течение инфекции и вакцинальных процессов в организме животных, иммунизированных различными бруцеллезными вакцинами. Сб. тр. ВИЭВ. М., 1965; 31: 8–12.
107. Пинигин А.Н. Прививки крупного рогатого скота против бруцеллеза вакциной из штамма № 19 в племенном совхозе «Чалобай». Матер. межвед. конф. по борьбе с бруцеллезом. Алматы. 1963; 141–142.
108. Профилактика и борьба с болезнями, общими для человека и животных. Сборник санитарных и ветеринарных правил. М.: Инф.-изд. центр Госкомсанэпиднадзора России. 1996; 256.
109. Рену Ж. Применение убитой вакцины против бруцеллеза из культуры Н.36. Бюлл. ВИЭВ. 1971; 1: 79–94.
110. Ромахов В.А. Разработка и усовершенствование средств, методов диагностики и системы мероприятий по борьбе с инфекционным эпидидимитом баранов и бруцеллезом животных. Дис. ... д-ра вет. наук в форме научного доклада. М., 1992; 50.

111. Ростов А.П. Экономическая эффективность с применением бруцеллезной вакцины из штамма 82 // Организация и экономика ветмероприятий в промышленном животноводстве. Казань. 1987; 46–49.
112. Ротов И.В. Опыт применения вакцины из штамма 19 в хозяйствах с острым течением бруцеллеза. Ветеринария. 1957; 8: 66.
113. Рягузов В.С. Новый вакцинный штамм бруцелл № 21. Сб. науч. тр. Дон-СХИ. Ветеринария. Ростов. 1967; 3: 5–17.
114. Салмаков К.М. Живая вакцина против бруцеллеза из штамма 82. Ветеринария. 1975; 7: 43–46.
115. Салмаков К.М. Изыскание и испытание новых вакцинных штаммов бруцелл. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. 1977; 29.
116. Саттаров А.С. Дифференциация вакцинного штамма *B. abortus* 19 от эпизоотических штаммов бруцелл. Тр. ВИЭВ. 1967; 33: 202–204.
117. Селиванов А.В., Жерносек Т.П., Гриницына Г.А. и др. Сравнительное изучение вакцинальной реакции и иммунитета при прививках крупного рогатого скота вакциными штаммами №19 Кашинцевской биофабрики и американским. Сб. науч. раб. СибНИИ. 1962; 2: 5–14.
118. Скляров О.Д., Климанов А.И., Калядин Д.В., Букова Н.К. и др. Совершенствование теста для дифференциальной диагностики бруцеллеза животных. Ветеринария. 2019; 1: 28–31.
119. Скашевская Е.И. Изучение специфичности и чувствительности реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации и иммунофлюоресценции при серологической диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 1971; 45.
120. Софонов Н.Б. Эффективность вакцины из штамма № 19 при ликвида-
- ции бруцеллеза мелкого рогатого скота в Узбекской ССР. Науч. тр. Уз-НИВИ. 1963; 15: 43–48.
121. Сочнев В.В., Григорьева Г.П. Комплексный подход к серологической диагностике бруцеллеза животных. Тез. докл. науч.-произв. конф. по актуальным вопросам ветеринарии. Горький. 1984; 11–14.
122. Столников В.И. Современное состояние учения о прививках против заразного выкидыша крупного рогатого скота, вызываемого бациллой Банга. Вестник сов. вет. 1927; 9: 258–261.
123. Студенцов К.П. Оздоровление крупного рогатого скота от бруцеллеза с включением в комплекс мероприятий вакцинации // Бруцеллез сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ним. Алма-Ата. 1958; 40–47.
124. Студенцова В.К., Каульник В.В., Амиреев С.А. и др. Оздоровление крупного рогатого скота от бруцеллеза с включением в комплекс мероприятий вакцинации // Бруцеллез сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ним. Алма-Ата. 1958; 40–47.
125. Студенцова В.К., Каульник В.В., Амиреев С.А. и др. Определение антигенов возбудителя бруцеллеза в РПГА с антителным диагностиком. Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным. Тез. докл. Всесоюз. конф. Новосибирск. 1989; 101–102.
126. Тимофеева В.П. Реакция связывания комплемента при банговской инфекции. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. М.: Сельхозгиз, 1934; 1: 40–42.
127. Тимофеева. В.П. Реакция связывания комплемента при банговской инфекции. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. М.: Сельхозгиз, 1934; 1: 40–42.
128. Тихомирова Е.А., Урбан В.П., Сочнев В.В. Экспресс-метод обнару-

- жения противобруцеллезных антител в сыворотке крови и молоке. Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным. Тез. докл. Всесоюз. конф. Новосибирск. 1989; 127–128.
129. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Л.: Колос, 1976; 280.
130. Триленко П.А. Инфекционный эпидидимит баранов. Ветеринария. 1970; 7: 51–56.
131. Триленко П.А. Особенности реакции агглютинации и кольцевой реакции при исследовании на бруцеллез сыворотки крови и молока. Ветеринария. 1954; 1: 34–35.
132. Уласевич П.С., Касьянов А.Н., Малахова Т.И. Результаты разработки и испытания роз-бенгал пробы при диагностике бруцеллеза животных. Современные проблемы зоонозных инфекций. Тез. докл. Всесоюз. межведом. конф. 1981; 150–151.
133. Уласевич П.С. Состояние и перспективы специфической профилактики бруцеллеза овец. Дис. ... д-ра вет. наук. М., 1965; 398.
134. Усманова Г.В., Муравьев В.Н. Динамика угасания постvakцинальных антител у крупного рогатого скота, привитого вакциной из штамма 19. Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. Алма-Ата. 1985; 9: 65–67.
135. Фимешевич М.А., Корзенко В.Н. Диагностика бруцеллеза у коров кольцевой реакцией (КР) с цельным молоком. Ветеринария. 1964; 10: 19–20.
136. Харченко А.А. Бруцеллез крупного рогатого скота в Центральной части степной зоны Северного Кавказа. Автореф. дис... канд. вет. наук. ИЭВСиДВ. Троицк, 1990; 16.
137. Хоч А.А., Лысков А.В. Эпизоотическое значение коров, реагирующих в РА в отдаленные сроки после ревакцинации их вакциной из штамма 19. Бруцеллез и туберкулез сельскохозяйственных животных. 1976.
138. Цветков Н.Е. Сравнительное значение реакции Райта и реакции связывания комплемента для борьбы с бруцеллезом. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. 1940; 55–64.
139. Elaine MS Dorneles, Nammalwar Sriranganathan & Andrey P. Lage Veterinary Research Recent advances in *Brucella abortus* vaccines volume 46, Article number: 76 (2015)
140. Цэрэндаш Ч. Опыт применения вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1 на крупном рогатом скоте в условиях МНР. Тр. ВИЭВ. 1984; 61: 21–26.
141. Цэрэндаш Ч. Применение вакцины из штамма Б. мелитензис Rev-1 на крупном рогатом скоте в Монголии. Тр. ВИЭВ. 1960; 52: 120–125.
142. Чекишев В.М., Файзрахманов Ш.Р., Киселев Е.А. и др. Дифференциация вакцинированных и больных бруцеллезом животных. Ветеринария. 1993; 8: 25–29.
143. Черемисин Г.Г. Роль специфической профилактики в борьбе с бруцеллезом крупного рогатого скота. Тезисы докл. Всесоюз. Конф. Омск. 1980; 253–255.
144. Черкасов В.В., Ростов А.П. Опыт оздоровления хозяйств от бруцеллеза с применением живой вакцины из штамма 82. Науч. тр. КазВИ. 1980; 135: 80–82.
145. Чернышева М.И., Вашкевич Р.Б., Степушин А.Е., Иванов Т.В. Реакция пассивной гемагглютинации при бруцеллезе северных оленей. Ветеринария. 1973; 1: 96–97.
146. Чулков П.А., Бельченко В.Б., Сайдашева С.Е. Экономическая эффективность применения роз-бенгал пробы при диагностике бруцеллеза животных. Биологические препараты против инфекционных болезней животных. Сб. науч. тр. ВГНКИ. 1981; 34–37.

147. Шмутер М.Ф., Лопатухина Л.Г., Сосунова А.Н. и др. Сравнительная характеристика трех вакциновых штаммов бруцелл (19 В А, 19 и 104М) в эксперименте при подкожном и накожном применении. ЖМЭИ. 1960; 6: 12–16.
148. Штрите В., Воскресенский Б., Котлярова Х. К бактериологии бруцеллеза при естественной инфекции и при экспериментальном заражении. Бруцеллез: Тр. экспедиции ВИЭМ по изучению овечьего бруцеллеза. 1937; 23–35.
149. Шувалова Е.П., Е.С. Белозеров, Т.В. Беляева и др. Инфекционные болезни. 8-е изд. Санкт-Петербург: Спецлит, 2016; 785.
150. Шувалова Е.П. Инфекционные болезни. 2-е изд. М.: Медицина, 1982; 341–354.
151. Шумилов К.В., Калмыков В.В., Бобылев А.Н., Селезнев Н.А. Результаты испытаний адьювант-вакцины из штамма *B. abortus* KB17/100. Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных. Международ. науч.-практическая конф., посвященная 70-летию Ставропольской НИВС. Ставрополь. 1999; 158–161.
152. Шумилов К.В., Акулов А.В. Изучение вакциновых штаммов *B. abortus* 104-М, *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 82 на крупном рогатом скоте. Тр. ВИЭВ. 1977; 45: 29–36.
153. Шумилов К.В., Калмыков В.В. Адьювант-вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота. Науч.-прак. конф. Новосибирск. 1995; 97–98.
154. Шумилов К.В., Калмыков В.В., Бобылев А.Н. и др. Адьювант-вакцины против бруцеллеза крупного рогатого скота из штамма KB 17/100 *B. abortus*. Ветеринария. 1999; 8: 17–24.
155. Шумилов К.В., Калмыков В.В., Бобылев А.Н. и др. Результаты испытаний адьювант-вакцины из штамма *B. abortus* KB 17/100. Междунар. науч.-практ. конф. Ставрополь. 1999; 158–161.
156. Шумилов К.В., Шихалеев Ю.Н., Касьянова Л.Ф. и др. Результаты изучения иммуногенных свойств убитых противобруцеллезных адьювант-вакцин на крупном рогатом скоте. Сб. науч. трудов СКЗНВИ. Новочеркасск. 1983; 49–53.
157. Юсковец М.К. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1960; 495, 228.
158. Юсковец М.К. Вакцинация при бруцеллезе крупного рогатого скота вакциной из штамма № 19. Ветеринария. 1946; 7: 16–18.
159. Юсковец М.К. Вакцинация при бруцеллезе крупного рогатого скота вакциной из штамма №19. Ветеринария. 1946; 7.
160. Юсковец М.К. Материалы по вакцинации коров и взрослых телок против бруцеллеза. Ветеринария. 1950; 10: 14–18.
161. Юсковец М.К. Некоторые данные изучения бруцеллезной вакцины из американского штамма №19. Предварительное сообщение. Ветеринария. 1944; 10: 17–20.
162. Юсупов О.Ю., Хаиров С.Г., Магомедов Г.Г., Абдурашидов М.А. Новое в профилактике и лечении болезней сельскохозяйственных животных в Дагестане. Сб. науч. тр. Новочеркасск. 1982; 13: 10–12.
163. Юсупов О.Ю. Специфическая профилактика бруцеллеза овец с применением вакцины из штамма *B. melitensis* Rev-1. Дис. ... д-ра вет. наук. М., 1986; 343.
164. Ющенко Г.В., Дунаев В.И. Об антигенном родстве *Yersinia enterocolitica* с представителями рода *Brucella*. Микробиология, эпидемиология и иммунология. 1980; 3: 48–51.
165. Яунслейнис Э. О ликвидации бруцеллеза крупного рогатого скота в

- Латвийской ССР. Мат. Междунар. конф. МЭБ. 1965. М.: Колос, 1967; 49–55.
166. Sola-Landa A., Pizarro-Cerda J., Grillo M.J., Moreno E., Moriyon I., Blasco J.M., Gorvel J.P., Lopez-Goni I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *J. Mol. Micr.* 1998; 29(1): 125–138.
  167. Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godefroid J., Walravens K., Letesson J.J. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect. Immun.* 2001; 69: 4816–4822.
  168. Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godfroid J., Walravens K., Letesson J.J. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella spp.* *Infect. Immun.* 2001; 69: 6264–6270.
  169. Andrews E., Salgado P., Folch H., Onate A. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide-dismutase: II. Induction of specific CD8+ cytotoxic lymphocytes and sensitized CD4+ IFN-gamma-producing cell. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50: 389–393.
  170. Avila-Calderón E., Araiza-Villanueva M., Cancino-Díaz J., López-Villegas E., Sriranganathan N., Boyle S., Contreras-Rodríguez A. Roles of bacterial membrane vesicles. *Arch. Microbiol.* 2015; 197: 1–10.
  171. Avrameas S., Ternynck T. Peroxidase-labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochem.* 1971; 8(12): 1175–1189.
  172. Baloglu S., Boyle S.M., Vemulapalli R., Sriranganathan N., Schurig G.G., Toth T.E. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeri-
  - olysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet. Microbiol.* 2005; 109: 11–17.
  173. Bang B., Stribold. The etiology of contagious abortion *Zeitschrif. Tiermed.* 1897; 103–105 (202).
  174. Belanger L., Sylvestre C., Dufour D. Enzyme linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta.* 1973; 48(1): 15–18.
  175. Berkowitz D.B., Webert D.W. The inactivation of horseradish peroxidase by a polystyrene surface. *J. Immunol. Methods.* 1981; 47(1): 121–124.
  176. Berman D.T., Jones L.M. Summary of research on brucellosis conducted in Department of veterinary accidence. Univ. of Wisconsin, Madison. USA, since 1975. WHO/BRUC / 80 363 WHO/ZOON / 80.137.
  177. Biberstein E.L., McGowan B., Hawrold R.D. Epididimitis of rams. Studies on immunity. Cornell. Veter. 1962; 52(2): 214–227.
  178. Bosman N. Skema vir die befeier an niteindalike Uitraeling van beesbrucellose. *J. South Afr. Vet. Ass.* 1980; 51(2): 75–81.
  179. Bossray H., Plomeet M.A. Laboratory reference vaccines to titre immunogenic activity of antibrucella vaccines in mice. *Ann. Rech. Vet.* 1983; 14(2): 163–168.
  180. Bricker B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 2002; 90: 435–446.
  181. Verger J.-M., Grimont F., Grimont P.A.D. and Grayon P. Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1985; 35: 292–295.
  182. Brucellosis. OIE. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.4 Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). 2016; 44.

- URL:[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.04\\_BRU-CELLOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRU-CELLOSIS.pdf).
183. Bullock S.L., Walle K.W. Evaluation of some of the parameters of enzyme linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 1977; 136: 279–285.
  184. Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Perry M.B. The structure of the lipopolysaccharide O-chain (M-antigen) and polysaccharide B produced by *Brucella melitensis* 16M. *FEBS Lett.* 1987; 216: 261–264.
  185. Burki F., Fey H. Standardization of complement fixation test on brucellosis. *Schweiz. Z. Pathol. Bacteriol.* 1953; 16(6): 945–954.
  186. Cabrera A., Saez D., Cespedes S., Andrews E., Onate A. Vaccination with recombinant Semliki Forest virus particles expressing translation initiation factor 3 of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Immunobiology*. 2009; 214: 467–474.
  187. Carrere L., Roux J. Hemagglutination passive d'hematies sensibilisees par antigenes brucellinques sélénies stésifiques. *Ann. Inst. Pasteur*. 1952; 83(6): 810–813.
  188. Cherwonogrodzky J.W., Nielsen K.H. *Brucella abortus* 1119-3 O-chain polysaccharide to differentiate sera from *B. abortus* S-19-vaccinated and field-strain-infected cattle by agar gel immunodiffusion. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1120–1123.
  189. Chin J.C. Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA. *Aust. Vet. J.* 1983; 60(9): 261–264.
  190. Cloeckaert A., Grayon M., Grepinet O. An IS711 Element Downstream of the bp26 Gene Is a Specific Marker of *Brucella spp.* Isolated from Marine Mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 835–839.
  191. Cocks E., Hebert N. *Brucella abortus* (strain 19) vaccine: potency tests in cattle: a) determination of the minimal protective dose in cattle; b) the effect of vaccinating calves previously inoculated with anti-*Brucella abortus* serum. *J. Biol. Standartiz.* 1980; 8(3): 165–175.
  192. Magnarelli L.A., Meegan J., Anderson J.F., Chappell W.A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20(2): 181–184.
  193. Corbel M.J. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses: Emerging Infectious Diseases. Jerusalem. Israel. 1997; 3(2): 213–221.
  194. Corbel M.J. International committee on systematic bacteriology — subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988; 38: 450–452.
  195. Corbel M.J., Bracewell C.D. The serological to rough and smooth *Brucella* antigens vaccinated with *Brucella abortus* strain 45/20 adjuvant vaccine. *Int. Symp. on Bruc. (II)* Rabat, 1975: Develop. biol. Stand. S. Karger. Basel. 1976; 31: 351–357.
  196. Corbel M.J., Elberg S.S., Cosivi O. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. Geneva. 2006.
  197. Corner L.A., Alton G.G. Persistence of *Brucella abortus* strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res. Vet. Sci.* 1981; 31: 342–344.
  198. Cotton U.S., Buck J.M., Smith H.E. Studies of five *Brucella abortus* (bovin) strains as immunising fat agent against Bang's disease (infectious abortion). *J. Av. Vet. Med. Assn.* 1934; 39(2): 232–247.
  199. De Ley J. A molecular approach to microbial taxonomy. *Int. J. Syst. Bact.* 1987; 37: 35–42.
  200. Del Vecchio. Molecular genotyping of *Brucella*. *V.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. Lamontagne.* 2002; 1: 443–448.
  201. Delpino M.V., Estein S.M., Fossati C.A., Baldi P.C., Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and Sura proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine*. 2007; 25: 6721–6729.

202. Diaz R., Toyos T., Solvo M.D. Studies on the polysaccharide and native haptene of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 09. 3<sup>rd</sup> Int. Simp. on Brucellosis, Aljiers, 1983. Basel. 1984; 213–220.
203. Diaz R., Garatea P., Jones L., Moriyon I. Radial immunodiffusion test with *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 10: 37–41.
204. Diaz R., Jones L., Leong D., Wilson J. Surface antigens of smooth *Brucellae*. *J. Bacteriol.* 1968; 96: 893–900.
205. Diaz R., Toyos J., Salvo M.D., Pardo M.L. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. *Ann. Rech. Vet.* 1981; 12: 35–39.
206. Vizcaino N., Cloeckaert A., Verger J.-M., Grayon M. et al. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and infection.* 2000; 2(9): 1089–1100.
207. Dorneles E.M., de Faria A.P., Pauletti R.B., Santana J.A., Caldeira G.A., Heinemann M.B., Titze-de-Almeida R., Lage A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). *Vaccine.* 2013; 31: 4856–4859.
208. Dubois Ch. Depistage des “Brucellas” chez la poule par la recherche des réactions d’allergie. *C.R. Soc. Biol.* 1934; CXIII: 1045–1047.
209. Dufrene P. Lutte contre la brucellose animal en France. III Intemat. Symp. Brucellosis, 1983. *Develop. Biol. Standard.* 1984; 56: 719–729.
210. Elaine M.S. Dorneles, Nammalwar Sriranganathan & Andrey P. Lage Veterinary Research Recent advances in *Brucella abortus* vaccines volume Ольсен 46, Article number: 76. 2015.
211. Engvall E., Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 1971; 8(9): 871–874.
212. Lamb V.L., Jones L.M., Scharing G.G., Berman D.T. Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 1979; 26(1): 240–247.
213. Romero C., Pardo M., Grillo M.J., Diaz R., Blasco J.M., Lopez-Goni I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12): 198–200.
214. Fluchauer O. Die Abortus — Bang — Ringprobe (ABR) zur Ferststellung von Bang Verdächtigen Vollmilch probe. *Bert. Tierarl. Wochensechr.* 1937; 53: 527.
215. Garcia-Yoldi D., Le Fleche P., Marin C.M., De Miguel M.J., Munoz P.M., Vergnaud G., Lopez-Goni I. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Vaccine.* 2007; 25: 2858–2862.
216. Gaumont R., Trap D.S., Gayot G. Immunization de la brebis contre l’infection expérimentale *Brucella melitensis*: Comparaison de onze vaccins. 1 Inten. Symp. Bruc. (II), Rabat. *Devel. Biol. Stand.* 1975; 31: 377–386.
217. Gilbert G.L., Hawes L.A. The antibody response to *Brucella* immunoglobulin response measured by immunosorbent assay and conventional tests. *Austr. N. Z. J. Med.* 1981; 11(1): 40–45.
218. Goel D., Rajendran V., Ghosh P.C., Bhatnagar R. Cell mediated immune response after challenge in Omp25 liposome immunized mice contributes to protection against virulent *Brucella abortus* 544. *Vaccine.* 2013; 31: 1231–1237.
219. Gonzalez-Smith A., Vemulapalli R., Andrews E., Onate A. Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. *Immunobiology.* 2006; 211: 65–74.

220. Gorat P., Pilet Ch. La vaccination de bovine par la vaccln B.19 et les vaccins sembiabiles. Ann. Inst. Pasteur. 1962; 102(6): 774–791.
221. He Y., Vemulapalli R., Schurig G.G. Recombinant Ochrobactrum anthropi expressing *Brucella abortus* Cu, Zn superoxide dismutase protects mice against *B. abortus* infection only after switching of immune responses to Th1 type. Infect. Immun. 2002; 70: 2535–2543.
222. Hinchliffe P. The detection of complement fixing antibodies by ELISA 9COMP) in Brucella serology. 3<sup>rd</sup> Int. Symp. on Brucellosis, Algiers, 1983. Basel. 1984; 465–469.
223. Horwell F.D., van Drimmeelen G.G. *Brucella melitensis* strain Rev 1 as a vaccine for cattle. J. S. Afr. Vet. Med. Assn. 1971; 42(3): 233–235.
224. Hu X.D., Yu D.H., Chen S.T., Li S.X., Cai H. A combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. DNA. Cell Biol. 2009; 28: 191–199.
225. Huddleson J.F. The differentiation of the species of the genus Brucella. Michigan State college of agriculture and applied science. Techn. bull. East Lansing. 1929; 101: 16.
226. Hurvell B. Serological cross-reactions between different Brucella species and *Yersinia enterocolitica*. Ummunodiffusion and immunoelectrophoresis. Acta veter. Scand. Stochholm. 1972; 13(4): 472–483.
227. Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Duncan J. R., Nielsen K., Perry M.B., Wright P.F. Immunoassays for discriminating between brucellosis infections and vaccinations. United States Patent 5,006,463. приоритет от 26.09.1986.
228. Moreno E., Speth S.L., Jones L.M., Berman D. T. Immunochemical characterization of Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. Infect. Immun. 1981; 31: 214–222.
229. Fernandez-Lago L., Moriyon I., Toyos J., Diaz R. Immunological identity of Brucella native gapten, polysaccharide B and *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9 native hapten. Infec. Immun. 1982; 38(2): 778–780.
230. Weynants V., Tibor A., Denoel P.A., Soegeerman C., Godfroid J. et al. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* 0:9 a case of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. Veter. Microbiol. 1996; 48(½): 101–112.
231. Institute of Vertebrate Biology Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic, Hubalek, Scholz, Sedlacek, Melzer, Sanogo, Nesvadbova. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2007; 7(4): 679–687.
232. Ivanov A.V., Salmakov K.M., Olsen S.C., Plumb G.E. A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation. Anim. Health Res. Rev. 2011; 12: 113–121.
233. Jain S., Afley P., Kumar S. Immunological responses to recombinant cysteine synthase A of *Brucella abortus* in BALB/c mice. World J. Microbiol. Biotechnol. 2013; 29: 907–913.
234. Jones L., Berman D. Bovine Brucellosis. WHO/BRUC / 80. 365. WHO/ZOON / 80.139.
235. Joubert L., Valette L. La vaccin antibrucellique inactive H 38 dans la prophylaxie de la brucellose des ruminants. Bull. Soc. Sc. Veter. Med. Comp. Lyon. 1969; 71(1): 65–92.
236. Ko J., Splitter G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16: 6578.
237. Koh S.R., Morley F.H.W. The Effect of Calfhood vaccination with strain 19 on the Serological Diagnosis end Eradication of Bovine Brucellosis. Austral. Vet. J. 1931; 57(12): 551–553.

238. Leal-Klevezas D.S., Lopez-Merino A., Martinez-Soriano J.P. Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. Arch. Med. Res. 1995; 26(3): 263–267.
239. Lehtonen O.P., Viljanen M.K. Antigen attachment in ELISA. J. Immunol. Method. 1980; 34(1): 61–70. 291.
240. Leyla G., Kadri G. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Vet. Microbiol. 2003; 93(1): 53–61.
241. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W., Lee H.J., Rhee M.H., Kim S. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice. J. Vet. Sci. 2012; 13: 287–292.
242. Gondara B., Merino A.L., Rogel M.A., Martinez-Romero E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(1): 235–240.
243. Lindberg A.A., Heggman S., Karlsson K. Enzyme immunoassay of the antibody response to *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* 09 infections in humans. J. Hyg. (Lond). 1982; 88(2): 295–307.
244. Lord V.R., Cherwonogrodzky J.W. Evaluation of polysaccharide, lipopolysaccharide, and beta-glucan antigens in gel immunodiffusion tests for brucellosis in cattle. Am. J. Vet. Res. 1992; 53: 389–391.
245. Lord V.R., Rolo M.R., Cherwonogrodzky J.W. Evaluation of humoral immunity to *Brucella* sp. in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. Am. J. Vet. Res. 1989; 50: 1813–1816.
246. Luo D., Ni B., Li P., Shi W., Zhang S., Han Y., Mao L., He Y., Wu Y., Wang X. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice. Infect. Immun. 2006; 74: 2734–2741.
247. Manthei C.A. Summary of controlled research with strain 19. Proceedings 63<sup>rd</sup> Ann. Meet. US Livestock Sanitary Association. 1959.
248. McDiarmid A. The degree and duration of immunity in cattle resulting from vaccination with S. 19 *Br. abortus* vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of brucellosis. Annotation. Vet. Rec. 1997; 69(37): 877–879.
249. McDiarmid A. The immunising value of a killed vaccine prepared from a mucoid strain of *Brucella abortus*. Res. Vet. Sci. 1960; 1: 269–272.
250. McEven A.D. Experiments on Contagious Abortion I. The Infectivity of *Br. abortus* strain for Cattle. II. Field Immunisation with a Vaccine prepared from strain 45. Vet. Rec. 1937; 49(51): 1585–1596.
251. McEven A.D., Pristley F. The vaccination of Guinea-pigs against *Brucella abortus* infection with living and heat-killed suspensions. Vet. Rec. 1940; 52(42): 743–744.
252. McEven A.D., Pristley F. Experiments of Contagious Abortion. Immunisation studies with vaccines of Craded Virulence. Vet. Rec. 1938; 50(25): 1097–1106.
253. McEven A.D., Samuel J. McA. *Brucella abortus*: Heat Stable protective Antigen Revealed by Adjuvant and Present in “Roug” Variant Strain 45/20: Immunisation Experiments on Guinea-Pigs. Vet. Rec. 1955; 67(29): 546–548.
254. McEwen A.D. Experiments on contagious abortion. The immunity of cattle inoculated with vaccines of graded virulence. Vet. Rec. 1940; 52: 815.
255. McEwen A.D., Samuel J.M.D. *Brucella abortus*: heat stable protective antigen revealed by adjuvant and present in a rough variant strain 45/20: immunization experiments on guinea pigs. Vet. Rec. 1955; 67: 546–548.
256. McKeon F.W. A recent trial comparing two 45/20 adjuvant *Brucella* vaccines. Int. Symp. Bruc. (II). Rabat. 1975. Develop. biol. Stand. 1976; 343–350.

257. Miranda K.L., Dorneles E.M., Pauletti R.B., Poester F.P., Lage A.P. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1<sup>®</sup>) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*. 2015; 33: 507–511.
258. Miranda K.L., Poester F.P., Minharro S., Dorneles E.M., Styren A.P., Lage A.P. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping. *Vaccine*. 2013; 31: 3014–3018.
259. Moreno E., Cloeckaert A., Moriyon I. Brucella evolution and taxonomy. *Vet. microbiol.* 2002; 90(1–4): 209–227.
260. Morgan W.J. The serological diagnosis of bovin brucellosis. *Vet. Rec.* 1967; 80(21): 612–620.
261. Mullis, K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 185: 335–350.
262. Muokhopadhyay A.A., Sen G.P., Gajinder Singh, Kumar S. Experimentation in mice for evaluation of two brucella vaccines. *Indian J. Anim. Health.* 1973; 12(1): 49–96.
263. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–1091.
264. Nicoletti P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1981; 178: 143–145.
265. Nicoletti P. Vaccination. In: Nielsen K., Duncan J.R. [eds.] *Animal Brucellosis*. CRC Press. Boca Raton. 1990.
266. Nielsen K., Cherwonogrodsky J., Duncan R., Bundle D. Enzyme immunoassay for the differentiation of antibody response to *Brucella abortus* infected and vaccinated cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1989; 50: 5–9.
267. Nielsen K., Gall D., Jolley G., Leishman S., Balsevicius P., Smith P., Nicoletti P., Thomas F.C. A homogeneous fluorescence polarization antibody assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods.* 1996; 195: 161–168.
268. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* Fifth Edition. Paris. France: Office International Des Epizooties. 2004.
269. Oliveira S.C., Harms J.S., Banai M., Splitter G.A. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from Brucella-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell Immunol.* 1996; 172: 262–268.
270. Oliveira S.C., Splitter G.A. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*. 1996; 14: 959–962.
271. Olsen S.C., Boyle S.M., Schurig G.G., Sriranganathan N.N. Immune responses and protection against experimental challenge after vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51 or RB51 overexpressing superoxide dismutase and glycosyltransferase genes. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16: 535–540.
272. Olsen S.C., Bricker B., Palmer M.V., Jensen A.E., Cheville N.F. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.* 1999; 66: 101–105.
273. Olsen S.C., Stoffregen W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines.* 2005; 4: 915–928.
274. Onate A.A., Cespedes S., Cabrera A., Rivers R., Gonzalez A., Munoz C., Folch H., Andrews E. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 2003; 71: 4857–4861.
275. Onate A.A., Vemulapalli R., Andrews E., Schurig G.G., Boyle S., Folch

- H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. Infect. Immun. 1999; 67: 986–988.
276. Palmer M.V., Cheville N.F., Jensen A.E. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. Vet. Pathol. 1996; 33: 682–691.
277. Pasquevich K.A., Estein S.M., Garcia Samartino C., Zwerdling A., Coria L.M., Barrionuevo P., Fossati C.A., Giambartolomei G.H., Cassataro J. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. Infect. Immun. 2009; 77: 436–445.
278. Pasquevich K.A., Ibanez A.E., Coria L.M., Garcia Samartino C., Estein S.M., Zwerdling A., Barrionuevo P., Oliveira F.S., Seither C., Warzecha H., Oliveira S.C., Giambartolomei G.H., Cassataro J. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. 2011; PLoS One 6:e16203.
279. Plommet M. Progress recente en immunisation contre l'infection *Br. abortus*. Immunization chez les bovines. Prev. Vet. Med. 1984; 2(1–4): 205–214.
280. Poester F.P., Goncalves V.S., Paixao T.A., Santos R.L., Olsen S.C., Schurig G.G., Lage A.P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. Vaccine. 2006; 24: 5327–5334.
281. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. 2012; PLoS One 7:e50214.
282. Popovic M., Trbic B. Antigena srodnask yersinis enterocolitica i nekin gram-negativik bacterija. Vet. Glasnik. 1983; 37: 6.
283. Pressman D., Campbell D.H., Pauling L. The agglutination of intact azo-erythrocytes by antisera homologous to the attached groups. J. Immunol. 1942; 44: 101.
284. Moreno E., Pitt M., Jones L., Schurig G., Berman D. Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. Infect. Immun. 1979; 138: 361–369.
285. Ouahrani-Bettache S., Soubrier M.-P., Liautard J.P. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella species* and strains. J. Appl. Bacteriol. 1996; 81(2): 154–160.
286. Bricker B.J., Ewalt D.R., MacMillan A.P., Foster O., Brew S. Related Articles, Nucleotide Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(3): 1258–1262.
287. Renoux G. Etudes sur la Brucellose ovine et caprine. XXII. Vaccination contre la brucellose de chevres-soumises aux conditions naturelles de l'infection. Arch. Inst. Pasteur Tunis. 1959; XXXVI. 36(1): 143–155.
288. Renoux G. Immunisation des caprins et ovins contre la Brucellose par un vaccin tue en excipient huileux. Rec. Med. Veter. 1960; 136(4): 291–302.
289. Renoux G. Immunisation des ovins et caprins contre la Brucellose au moyen d'un vaccin tue incorpore a una huile minérale. Annales de l' Institut Pasteur. 1962; 103(5): 786–801.
290. Cloeckaert A., Verger J.-M., Grayon M., Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. Microbiology. 1995; 141(9): 2111–2121.
291. Rigby C.E., Fraser A.D. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. Can. J. Vet. Res. 1989; 53(3): 326–330.

292. Romero C., Gamazo M., Lopez-Goni I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 615–617.
293. Saez D., Fernandez P., Rivera A., Andrews E., Onate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*. 2012; 30: 1283–1290.
294. Salmakov K.M., Fomin A.M., Plotnikova E.M., Safina G.M., Galimova G.M., Salmakova A.V., Ivanov A.V., Panin A.N., Sklyarov O.D., Shumilov K.V., Klimanov A.I. Comparative study of the immunobiological properties of live brucellosis vaccines. *Vaccine*. 2010; 28(5): F35–40.
295. Schurig G., Boyle S., Sriranganathan N. *Brucella abortus* vaccine strain RB51: a brief review. *Arch. Med. Vet.* 1995; 27: 19–22.
296. Schurig G.G., Roop R.M. 2nd, Bagchi T., Boyle S., Buhrman D., Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 1991; 28: 171–188.
297. Kittelberger R., Reichel M.P., Joyce M.A., Staak C. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. *Vet. Microbiol.* 1997; 57(4): 361–371.
298. Singha H., Mallick A.I., Jana C., Fatima N., Owais M., Chaudhuri P. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against *Brucella abortus*. *Vaccine*. 2011; 29: 4720–4727.
299. Sislem-Egas F., Cespedes S., Fernandez P., Retamal-Diaz A., Saez D., Onate A. Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the BAB1\_0263 and BAB1\_0278 open reading frames of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*. 2012; 30: 7286–7291.
300. Smithwick C., Nielsen K. A water soluble antigen unique to *Brucella abortus* strain 19: Isolation and immunological characterization. *J. Biol. Chem.* (submitted). 1982; 310-1-314.
301. Mullis K.B., Falloona F., Scharf S., Saiki R.K., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986; 51: 263.
302. Da Costa M., Guillou J.-P., Garin-Bastui B., Thiebaud M., and Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 1996; 81: 267–275.
303. Taylor D. C. A case of brucellosis in a killer whale. In: Proceedings of the 10<sup>th</sup> Symposium for the European Association for Aquatic Mammals, Antwerpen. *Aquat. Mamm.* 1982; 9: 4–5.
304. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., and Verger J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. Bacteriological methods: Institut National de la Recherche Agronomique. Paris. France. 1988; 13–61.
305. Thillerot M. A propos de la Reglementation de l'utilisation des vaccins Antibrucelliques. *Bull. Soc. Veter. Practique France*. 1971; 55(6): 311–323.
306. Tryland M., Derocher A.E., Wiig O. & Godfroid J. *Brucella* sp. antibodies in polar bears from Svalbard and the Barents sea. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37: 523–531.
307. Leal-Klevezas D.S., Martinez-Vazquez I., Garcia-Cantu J., Lopez-Merino A., Martinez-Soriano J.P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Vet. Microbiol.* 2000; 75(1): 91–97.
308. Van Drimmelen G.C., Horwell F.D. Preliminary findinga with the use of *Brucella melitensis* strain Rev 1 as a vaccina against brucellosis in cattle. *Bull. de l'office Intemat. Epizoot.* 1964; 62: 987–995.
309. Velikovsky C.A., Cassataro J., Giambartolomei G.H., Goldbaum F.A., Esstein S., Bowden R.A., Bruno L., Fossati C.A., Spitz M. A DNA vaccine encoding

- lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infect. Immun. 2002; 70: 2507–2511.
310. Velikovsky C.A., Goldbaum F.A., Cassataro J., Estein S., Bowden R.A., Bruno L., Fossati C.A., Giambartolomei G.H. Brucella lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. Infect. Immun. 2003; 71: 5750–5755.
311. Vemulapalli R., Contreras A., Sanakkayala N., Sriranganathan N., Boyle S.M., Schurig G.G. Enhanced efficacy of recombinant *Brucella abortus* RB51 vaccines against *B. melitensis* infection in mice. Vet. Microbiol. 2004; 102: 237–245.
312. Vemulapalli R., Cravero S., Calvert C.L., Toth T.E., Sriranganathan N., Boyle S.M., Rossetti O.L., Schurig G.G. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7: 114–118.
313. Vemulapalli R., Duncan A.J., Boyle S.M., Sriranganathan N., Toth T.E., Schurig G.G. Cloning and sequencing of yajC and secD homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with *B. abortus* RB51. Infect. Immun. 1998; 66: 5684–5691.
314. Vemulapalli R., He Y., Buccolo L.S., Boyle S.M., Sriranganathan N., Schurig G.G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. Infect. Immun. 2000; 68: 3927–3932.
315. Vemulapalli R., He Y., Cravero S., Sriranganathan N., Boyle S.M., Schurig G.G. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. Infect. Immun. 2000; 68: 3286–3289.
316. Verges J.M. Brucella et brucellose. Cours international de microbiologie des aliments. Unite “Lait et produits laitiers”. Institut Pasteur de Lille. 1999.
317. Verma SK, Jain S, Kumar S [2012] Immunogenicity and protective potential of a bacterially expressed recombinant dihydrolipoamide succinyltransferase [rE2o] of *Brucella abortus* in BALB/c mice. World J Microbiol Biotechnol 28:2487–2495.
318. Viana F.C., Silva J.A. Vaccinacío Br. bovinos odullos contra brucellosis (Amostra B-19) com dose reduzida por via subsutabee. Agr. Br. Med. Vet. Zootech. 1986; 38(3): 331–341.
319. Vizcaino N., Cloeckaert A. et al. Characterization of a *Brucella species* 25-Kilobase DNA Fragment Deleted from *Brucella abortus* Reveals a Large Gene Cluster Related to the Synthesis of a Poly-saccharide. Infect. Immun. 2001; 69(11): 6738–6748.
320. Vizcaino N., Cloeckaert A. et al. Molecular Characterization of *Brucella Species* Large DNA Fragment Deleted in *Brucella abortus* Strains: Evidence for a Locus Involved in the Synthesis of a Poly-saccharide. Infect. Immun. 1999; 67(6): 2700–2712.
321. Waghela S. Serological response in cattle, sheep and goats in Kenya vaccinated with Killed *Brucella melitensis* strain H38 adjuvant vaccine. Vet. Rec. 1983; 112(20): 476–479.
322. Willson Taylor A., McDiaraid A. The Stability of the Avirulent characters of *Brucella abortus* Strain 19 and strain 45/20 in Lactating and pregnant cows. Vet. Rec. 1949; 61(23): 317–318.
323. Wortington R.W., Tonder E.M. Van Mulders M.S. The incidence of *Brucella ovis* infection in South African rams: a serological survey. J. S. Afr. Vet. Med. Assoc. 1972; 43(1): 83–85.

324. Yang X., Becker T., Walters N., Pascual D.W. Deletion of znuA virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge. *Infect. Immun.* 2006; 74: 3874–3879.
325. Yu D.H., Hu X.D., Cai H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. *DNA Cell Biol.* 2007; 26: 435–443.
326. Yu D.H., Li M., Hu X.D., Cai H. A combined DNA vaccine enhances protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Brucella abortus* in the presence of an IL-12 expression vector. *Vaccine*. 2007; 25: 6744–6754.
327. Yu. D.H., Kulakov K., Erdenebaatar J., Zheludkov M.M., Korenberg E.I. Genetic Characterization of *Brucella melitensis* Isolates from Mongolia, Russia, and Azerbaijan. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2011; 26(2): 8–12.
328. Zhao Z., Li M., Luo D., Xing L., Wu S., Duan Y., Yang P., Wang X. Protection of mice from *Brucella infection* by immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing A L7/L12 and BLS fusion antigen of Brucella. *Vaccine*. 2009; 27: 5214–5219.

# ТУБЕРКУЛЕЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Найманов А.Х., Букова Н.К.

**Определение болезни.** Туберкулез — хроническое инфекционное заболевание практически всех видов животных и человека, характеризующееся образованием в различных органах специфических бугорков — туберкулов, вызываемое патогенными микобактериями туберкулеза.

Туберкулез крупного рогатого скота наносит значительный экономический ущерб животноводству и представляет реальную опасность заражения людей, поэтому организация и проведение обязательных противотуберкулезных мероприятий остаются актуальной проблемой [30].

Туберкулез занимает особое место среди инфекционных болезней животных, так как в течение нескольких лет может протекать в скрытой форме, без проявления клинических признаков болезни, не влияя на продуктивность и жизнедеятельность животных.

Резервуар инфекции так разнообразен и обширен, что мероприятия по борьбе с туберкулезом крупного рогатого скота не могут ограничиться только этим видом животных, а должны охватить всех домашних и диких животных, а также объекты внешней среды.

До настоящего времени не разработаны высокоэффективные средства иммунной защиты и лечения, поэтому основой профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулезе животных является диагностика болезни [25].

Диагноз на туберкулез у животных устанавливают, руководствуясь следующими нормативными документами:

— Санитарные и Ветеринарные правила «Профилактика и борьба с заразны-

ми болезнями, общими для человека и животных. 10. Туберкулез», утв. Госкомсанэпиднадзором России 16.05.1996 и Департаментом ветеринарии Минсельхозпрана России 18.06.1996;

— Наставление по диагностике туберкулеза животных, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 18.11.2002. М., 2002. 64 с.

**Этиология.** В соответствии с современной классификацией возбудители болезни относятся к роду *Mycobacterium*, семейству *Mycobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales*. Микобактерии имеют палочковидную форму, грамположительны, обладают кислото-, щелоче- и спиртоустойчивостью, являются аэробами, неподвижны, спор и капсул не образуют.

Перечень признаков для отнесения микроорганизмов к роду микобактерий включает также высокое содержание липидов в клетке и особенно в клеточных стенках; содержание Г+Ц (гуанидин и цитозин) в ДНК колеблется от 62 до 70 мол %.

По способности синтезировать мицелевые кислоты и процентному содержанию Г+Ц в ДНК микобактерии вплотную приближаются к группе нокардиоформных актиномицетов и коринебактериям, но различаются по устойчивости к лизоциму и активности арильсульфатазы.

Микобактерии растут медленно и очень медленно. Оптимальная температура роста микобактерий имеет широкий диапазон для различных видов и составляет 30–45°C.

Туберкулез у животных вызывают микобактерии туберкулеза бычьего (*M. bovis*), человеческого (*M. tuberculosis*) и птичьего (*M. avium*) видов. Каждый

из этих видов микобактерий является патогенным для животных соответствующего вида и человека, возможно их перекрестное заражение.

*M. bovis* патогенны для крупного рогатого скота. К ним восприимчивы все млекопитающие животные и человек.

К *M. tuberculosis* восприимчивы, кроме человека, свиньи, козы, кошки и собаки, а также попугай. *M. tuberculosis* в основном сенсибилизирует крупный рогатый скот к туберкулину и только иногда может вызывать незначительные очаги в отдельных лимфатических узлах.

*M. avium* — возбудитель туберкулеза птиц. Может вызывать патологические изменения у свиней. У крупного рогатого скота вызывает кратковременную сенсибилизацию организма к туберкулину.

*M. bovis* — возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота. Морфологические и тинкториальные свойства: в мазке, окрашенном по Цилю—Нильсену, имеют вид полиморфных, тонких, спирто-, щелоче- и кислотоустойчивых палочек, часто изогнутых. При выделении из патологического материала проявляет микроаэрофильные свойства, не требует глицерина. В последующем хорошо культивируется в аэробных условиях и быстрее растет на глицериновых средах. Температурный оптимум 37–38°C.

На плотных питательных средах культура растет медленно, образуя морщинистый налет, колонии мелкие, сухие, блестящие, гладкие, полушиаровидные, с неровными краями, цвета слоновой кости, при старении приобретают складчатость. Первичный рост на плотных питательных средах обычно наблюдают на 20–60-е сутки инкубирования.

*M. bovis* вызывает туберкулез у крупного и мелкого рогатого скота, свиней, верблюдов, лошадей, оленей, собак, кошек, других животных и человека, т.е. обладает патогенными свойствами для более широкого круга животных, чем

*M. tuberculosis*. Из лабораторных животных восприимчивы кролики, морские свинки, в несколько меньшей степени — мыши и хомяки. Птицы к заражению *M. bovis* устойчивы. Для идентификации *M. bovis* учитывается их способность вызывать при экспериментальном заражении генерализованный туберкулезный процесс у морских свинок и кроликов.

*M. tuberculosis* — возбудитель туберкулеза человека. Эти микобактерии дают первичный рост при посеве патологического материала на 21–60-й день. Пассированные культуры растут быстрее — на 10–21-й день. На плотной яичной среде, содержащей глицерин, культуры имеют кремовый оттенок и растут в виде шероховатых R-колоний, но могут быть гладкие, сливающиеся между собой (S-вариант). На жидкой питательной среде образуют морщинистую грубую пленку, а иногда придонный крошковатый рост. Температурный оптимум 37–38°C. При 22 и 45°C не растут. Морфологически в мазке, окрашенном по Цилю—Нильсену, имеют вид полиморфных, тонких, спирто-, щелоче- и кислотоустойчивых палочек, часто изогнутых. Патогенны для человека, обезьян, морских свинок, белых мышей, свиней, собак, кошек, попугаев. У крупного рогатого скота, как правило, обусловливают сенсибилизацию организма к туберкулину для млекопитающих и лишь изредка вызывают ограниченные изменения, преимущественно в лимфатических узлах, регионарных местах проникновения микобактерий.

*M. avium* отличаются от микобактерий человеческого и бычьего видов морфологией колоний. Колонии их мягкие, слизистые, серовато-белые, редко слегка желтоватые. Рост появляется к концу 15–30 дня, иногда позже, при пересевах — к 7–10-му дню. В субкультурах растут в виде гладкого, влажного налета. Куль-

туры микобактерий лучше растут при температуре 43–45°C. Микроскопически *M. avium* в мазках из культур представляют собой тонкие кислотоустойчивые палочки, более длинные и полиморфные в мазках-отпечатках из органов зараженных кур и кроликов. Патогенны в основном для птиц, кроликов, белых мышей, могут вызывать патологические изменения в органах у свиней и животных других видов.

Поскольку *M. avium* и *M. intracellulare* очень схожи между собой и дифференцировать их довольно сложно, было принято решение считать их как один вид *M. avium complex* (MAC), объединяющий эти два вида микобактерий. Внутри вида *M. avium* выделяют несколько подвидов: *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. avium subsp. silvaticum* и *M. avium subsp. hominissuis*. MAC «вездесущи», они находятся в земле, в минеральных источниках, соленой воде, во всех природных водоемах и водопроводной воде, поэтому возможно заражение людей и животных из различных источников.

От крупного рогатого скота выделяют в основном *M. bovis* (78,4%), реже *M. avium* (21,1%) и очень редко *M. tuberculosis* (0,5%) [26].

Измененные формы микобактерий, имеющие дефекты клеточных стенок, приобретают особое значение, так как повреждения, связанные с дефектом или частичной утратой клеточной стенки, вызывают глубокие морфологические и функциональные изменения микобактерий, конечным результатом которых является возникновение L-форм этих микобактерий, впервые описанных в 1945 году.

L-формы микобактерий туберкулеза могут находиться в макроорганизме в стабильном и нестабильном состоянии, то есть реверсировать в исходный микробный вид с восстановлением

вирулентности. Ревертанты микобактерий могут полностью или частично сохранять свои свойства микробной клетки и стать причиной возникновения туберкулеза. L-трансформация микобактерий туберкулеза может происходить под воздействием факторов внешней среды, применяемых химиопрепаратов, защитных реакций организма [11, 39].

Биологическое значение L-форм заключается в том, что они являются формой выживания и размножения микобактерий. Таким образом, L-формы микобактерий имеют важное теоретическое и практическое значение, так как затрудняют микробиологическую диагностику микобактериозов, играют значительную роль в латентном течении и рецидивах туберкулеза.

**Эпизоотология.** Первичным источником инфекции при туберкулезе является зараженный организм животного, который становится естественной средой обитания, сохранения, размножения и накопления патогенного возбудителя.

Источниками инфекции могут быть больные туберкулезом животные и человек. В естественных условиях заражение происходит через дыхательные пути (при содержании больных животных вместе со здоровыми) и пищеварительный тракт — с инфицированным кормом. Примерно в 0,3% случаев от больных туберкулезом коров рождаются телята, заразившиеся внутриутробно. В редких случаях животные могут заражаться через соски вымени, половые органы и кожу. Туберкулез крупного рогатого скота, как правило, протекает с поражением лимфатических узлов и паренхиматозных органов. В отдельных случаях инфекция может принять форму латентного микробиоза [40].

Продолжительность инкубационного периода при туберкулезе крупного рогатого скота колеблется от нескольких

дней до нескольких месяцев и даже лет, что прежде всего зависит от физиологического состояния организма животного и его естественной сопротивляемости в момент заражения. При заражении животных в молодом возрасте болезнь, как правило, проявляется после первого, второго или третьего отела.

Во время инкубационного периода возбудитель размножается в организме животного, накапливаются продукты его жизнедеятельности и нарушается обмен веществ, то есть происходит перестройка организма. В результате сенсибилизации протеинами микробной клетки развиваются иммунобиологические процессы, ведущие к определенным качественным изменениям физиологического состояния организма и дальнейшему развитию специфических изменений, характерных для туберкулеза.

При туберкулезе возможна множественная локализация поражений — в лимфатических узлах, легких, вымени, половых органах, желудочно-кишечном тракте, костях, что обуславливает и множественность путей выделения возбудителя болезни.

В некоторых случаях могут быть поражены только легкие, но выделение микобактерий в основном происходит через дыхательные пути и с фекалиями, так как мокрота с возбудителями туберкулеза часто проглатывается и попадает в желудочно-кишечный тракт.

Эпизоотический процесс туберкулеза крупного рогатого скота развивается только при взаимодействии источника возбудителя *M. bovis*, механизма его передачи и восприимчивых животных. При исключении любого из этих звеньев эпизоотический процесс прекращается.

После заноса возбудителя туберкулеза в ранее благополучное по данной болезни хозяйство она протекает в виде энзоотии. Туберкулез начинается со спорадических случаев, затем отно-

сительно медленно распространяется, поражая значительную часть поголовья. Быстрота охвата поголовья зависит от ряда причин, в первую очередь от условий содержания животных, от путей проникновения в восприимчивый организм и вирулентности возбудителя.

Источником инфекции может быть только зараженный организм животного, который является естественной средой обитания, где возбудитель туберкулеза сохраняется, размножается и накапливается. Самый интенсивный источник возбудителя инфекции — клинически больные туберкулезом животные. В период клинического проявления болезни возбудитель регулярно и в больших количествах выделяется во внешнюю среду различными путями (с калом, мочой, мокротой, истечениями из глаз, носа и др.). При хроническом течении болезни выделение возбудителя происходит менее интенсивно. Пути выделения зависят от локализации микобактерий в организме. При туберкулезе с поражением легких выделение микобактерий происходит с мокротой, при поражении вымени — с молоком, при поражении кишечника — с калом. В случае поражения нескольких органов выделение возбудителя может происходить одновременно разными путями [3].

Микобактерии туберкулеза длительное время сохраняются в объектах внешней среды. Воздух как фактор передачи имеет большое значение при содержании больных и здоровых животных в одном помещении. В воздухе возбудитель попадает с выделениями больных животных и находится в капельках слизи, где микобактерии туберкулеза остаются во взвешенном состоянии, образуя своеобразный бактериальный аэрозоль, который с потоками воздуха может перемещаться на расстояние до 10 м.

В естественных условиях крупный рогатый скот заражается туберкулезом через дыхательные пути или желудочно-кишечный тракт, реже внутриутробно и при случке. Иногда животные заражаются через кожу, кастрационные раны и соски вымени.

Аэрогенный механизм передачи возбудителя приобретает большое эпизоотическое значение при интенсивном развитии скотоводства в условиях стойлового содержания, с концентрацией поголовья животных на ферме. Алиментарный механизм передачи туберкулеза у крупного рогатого скота наблюдается при попадании микобактерий с выделениями животных (исправления, мокрота) в корма, воду, пастищную растительность, а также при спаивании молодняку молока от больных коров.

Интенсивность проявления эпизоотического процесса при туберкулезе зависит от комплексного взаимодействия биологических, природных и экономических факторов. Зональные особенности проявлений эпизоотического процесса туберкулеза крупного рогатого скота зависят от природно-климатических, социально-экономических, хозяйственных факторов и формы ведения животноводства.

Т.Ф. Оттен и соавт. указывали, что патогенность — это генетический признак, который можно определить как потенциальную способность микроорганизма вызывать инфекционное заболевание. Степень патогенности определяется термином «вирулентность» [32].

Среди факторов вирулентности микобактерий туберкулеза главную роль имеет наличие кордфактора; у нетуберкулезных микобактерий кордфактор отсутствует. О вирулентности микобактерий туберкулеза судят по тяжести вызываемых ими заболеваний. Вместе с тем вирулентность зависит и от состояния макроорганизма. Снижение

неспецифической устойчивости в связи с неполнотой кормления и неудовлетворительными условиями содержания обуславливает повышение чувствительности животных к возбудителю туберкулеза.

**Патогенез.** Как и любое воспаление, туберкулез начинается с острой реакции, не имеющей специфичности, и сочетает в себе альтерацию (разрушение стенок кровеносных сосудов, распад ядер и клеточных элементов), экссудацию (выход форменных элементов крови за стенку сосудов), пролиферацию (размножение клеточных элементов).

При естественном заражении крупного рогатого скота возбудителем туберкулеза инкубационный период длится от 16–45 дней до нескольких месяцев.

В развитии инфекционного процесса болезни выделяют три стадии. На стадии формирования первичного комплекса происходит иммунологическая перестройка организма. Микобактерии проникают в межклеточные щели слизистых оболочек, где их поглощают фагоциты, с которыми возбудитель попадает в кровь и лимфу и разносится по организму. Возбудитель может «оседать» в легких, печени, лимфоузлах и других органах. Образование туберкулезного узелка происходит в результате воспалительного процесса на месте первичного скопления микобактерий. Стадия формирования первичного комплекса может быть полной, при этом поражается как орган, так и регионарные лимфатические узлы. Неполная стадия характеризуется развитием инфекционного процесса только в регионарном лимфоузле, при этом в органе изменения отсутствуют.

На стадии ранней генерализации при доброкачественном течении болезни первичный очаг подвергается обызвествлению и происходит дальнейшее развитие инфекционного процесса.

В организме с пониженной резистентностью инкапсуляция возбудителя в первичном очаге выражена слабо. Стенки туберкулезного узелка расплавляются, освободившиеся микобактерии попадают в здоровые ткани, фиксируются и размножаются, образуя множество мелких узелков (милиарный туберкулез), которые соединяются в крупные туберкулезные фокусы. Из туберкулезных фокусов микобактерии попадают в кровь, что приводит к генерализации процесса с образованием туберкулезных очагов в различных органах — в легких, почках, печени, селезенке, половых органах и др.

На стадии поздней генерализации поражаются все внутренние органы и лимфатические узлы больного туберкулезом животного. При длительном течении болезни в легких могут образовываться крупные туберкулезные очаги и каверны. Туберкулезные каверны могут соединяться с просветом бронхов, их содержимое разжижается и выделяется при кашле с мокротой.

Для туберкулезного процесса характерно волнообразное течение. В организме с высокой резистентностью происходит «заживление» первичного очага инфицирования. Снижение резистентности организма при нарушениях кормления и содержания, при физиологических перестройках, инфекционных и эндокринных заболеваниях способствует рецидиву (обострению) туберкулеза.

**Клиническая картина.** При естественном заражении возбудителем туберкулеза клинические признаки могут появиться через месяцы и даже через годы после заражения. Ухудшение общего состояния животного при туберкулезе выражается в прогрессирующем исхудании при сохранении аппетита и удовлетворительном кормлении, быстрой утомляемости при передвижении и

снижении продуктивности. Температура тела временами повышается, более стойкое повышение температуры тела наблюдается при обострении течения процесса туберкулеза.

Клиническое проявление туберкулеза у крупного рогатого скота зависит от локализации процесса и степени поражения органов. Начальные стадии туберкулеза, как правило, не имеют клинических признаков. Заметными становятся лишь значительные поражения, сопровождающиеся нарушением общего состояния организма или расстройством функций отдельных органов.

При туберкулезе у крупного рогатого скота поражаются органы (легкие, кишечник, вымя) и лимфоузлы (средостенные, подчелюстные, заглоточные, бронхиальные, брызговые).

При легочной форме туберкулеза температура тела у животного повышается до +40°C, видимые слизистые оболочки анемичны, появляется кашель, вначале резкий, короткий и сильный, затем частый, слабый и болезненный. Отхаркивания у крупного рогатого скота почти не наблюдается, отделяемая при кашле бронхиальная слизь проглатывается или эвакуируется через носовые ходы в виде слизисто-гнойных истечений. При аусcultации легких обнаруживаются хрипы, при перкуссии — участки притупления. При поражении плевры отмечается болезненность при пальпации между ребрами. Кроме того, развивается одышка, снижается аппетит, упитанность и продуктивность.

Кишечная форма туберкулеза у крупного рогатого скота сопровождается диареей (фекалии — с примесью слизи, гноя и крови). У больного животного наблюдаются быстрое истощение и обезвоживание, нарастающая физическая слабость.

Туберкулез молочной железы характеризуется увеличением и уплотнением

надвыменных лимфатических узлов. Лимфоузлы становятся малоподвижными и бугристыми. В пораженных долях вымени пальпируются уплотненные безболезненные фокусы. Если площадь поражения значительная, изменяется конфигурация доли. При дежении больного животного выделяется водянистое молоко с примесью крови или творожистой массы.

При туберкулезе половых органов у коров усиливаются половая охота, яловость; при поражении матки возникают abortiones. У быков при туберкулезе половых органов развивается орхит.

Клинические признаки туберкулеза у крупного рогатого скота не являются типичными только для этого заболевания, и часто они вообще отсутствуют. Тем не менее клиническое обследование проводить необходимо, поскольку некоторые больные животные, особенно с пониженной упитанностью, утрачивают способность реагировать на туберкулин. Одновременно с этим они могут иметь открытый туберкулезный процесс и являться очень опасным источником распространения возбудителя туберкулеза.

Следует помнить, что клинические признаки туберкулеза проявляются только при длительном течении процесса. Поэтому в практических условиях при оздоровлении неблагополучных хозяйств рекомендуется выбраковывать всех старых животных, независимо от упитанности и ответной реакции на туберкулин [9, 25, 36].

**Патологоанатомические изменения.** При туберкулезе крупного рогатого скота изменения чаще всего обнаруживаются в лимфатических узлах головы и легких. При этом макроскопически лимфатический узел увеличен, плотный при пальпации. На разрезе выявляются участки мозговидного набухания, поверхность разреза выглядит влажной. Наряду с

этими участками обнаруживают очаги некроза, не всегда отчетливо выступающие, окрашенные в слегка желтоватый цвет, творожистой консистенции, плотно соединенные с окружающей тканью.

Размеры узелка-туберкула различны — от просяного зерна до обширных конгломератов. Туберкулезное воспаление в лимфатическом узле может оформиться лучистым казеозом. При этом лимфоузел увеличен в размере, окружен отечной рыхлой тканью, на разрезе представляет собой творожистый некроз с лучистым строением, соответствующим ходу синусов узла. Лучистый некроз — одна из тяжелых форм туберкулеза крупного рогатого скота.

Различают три формы туберкулезного лимфаденита: бугорковый, диффузный и смешанный. При бугорковой форме некрозы находят в корковом слое лимфоузлов. Среди хорошо видимых некрозов выявляют мелкие, отчетливо ограниченные соединительнотканной капсулой туберкулы.

При диффузной форме лимфатические узлы увеличены или нормальных размеров, на поверхности разреза сплошная крошащаяся творожистая масса, местами полностью обызвествленная. При смешанной форме в лимфатических узлах вместе с бугорками располагаются и очаги диффузного характера.

Чаще всего выявляют поражения в виде одиночных или множественных узелков, имеющих тенденцию к слиянию, то есть образованию конгломерата. Узелок, как правило, окружен фиброзной капсулой, в центре с творожистым некрозом, содержащим известье. Если процесс длительный, старый некроз полностью обызвествляется. При тщательном рассмотрении узелка на разрезе видно, что некроз не имеет целостного формирования и состоит из отдельно лежащих глыбок, окруженных капсулой. Границы некротической ткани имеют

фестончатые края, проникающие вглубь узелка и охватывающие новые участки. Внутренняя поверхность капсулы неровная, шероховатая, плотно соединена с некрозом, не позволяет вылущиваться казеозным массам при надавливании.

Таким образом, макроскопически туберкул представляет собой инкапсулированное округлое образование с некротическим центром, не имеющим ровных границ, частично или полностью обызвествленным. Цвет некроза также имеет существенное значение. Так, некротические массы серо-зеленого цвета могут быть обусловлены паразитами, а ярко-желтого цвета — микозного происхождения.

Поэтому при патологоанатомическом осмотре отмечают локализацию и величину гранулемы, воспалительную реакцию органа и лимфатических сосудов, окружающую туберкул капсулу. Определяют, как расположены узелки — рассеянно, изолированно или формируют конгломерат с общей капсулой. Устанавливают цвет, форму и консистенцию содержимого узелка на разрезе:творожистое, сметанообразное, жидкое, в виде зерен или полностью обызвествлено; определяют, насколько плотно некроз связан с окружающей капсулой.

Следует указать и расположение инкапсулированных некрозов. Для туберкулеза не характерны разбросанные и лежащие отдельно друг от друга узелки. Напротив, образование конгломерата узелков, когда в большом очаге формируются дочерние очажки, является специфическим признаком туберкулеза.

При поражении плевры у крупного рогатого скота характерна жемчужница. Жемчужные разращения перикарда и эпикарда ничем не отличаются от таковых на плевре. Поражение слизистых оболочек горлани, трахеи, съчуга, кишечника, матки может быть в виде узелков, далее распадающихся в язвы;

встречается также изъязвление слизистых оболочек без предварительного образования узелков.

Характерные для туберкулеза патологоанатомические изменения необходимо дифференцировать от изменений при псевдотуберкулезе, паратуберкулезе, актиномикозе, паразитарных поражениях, абсцессах и новообразованиях.

#### **При туберкулезе (*Mycobacterium bovis*):**

Основная форма поражения — туберкул (узелок). Очаги некроза желтого цвета, творожистой консистенции. Масса некроза плотно соединена с капсулой и не вылущивается. Внутренняя поверхность капсулы выглядит неровной из-за вторичных некрозов. Узелки чаще образуют конгломераты или в большом очаге некроза формируются дочерние очажки. Лимфоузлы увеличены, плотные, окружающая их ткань и капсула отечны. В легких — пневмонии: ацинозная, лобулярная, лobarная. Творожистый некроз, частично обызвествленный, с множественными узелками и центральным казеозом. Основное при пневмонии — изменения в лимфоузлах в виде казеозного некроза. Печень, почки, селезенка, серозные покровы поражаются только при генерализации процесса. Туберкулезная гранулема представляет собой узелок с округлыми краями и центром в виде некроза или некробиозного состояния: кариопикноз, карирексис, кариолизис. В узелке три вида клеточных элементов: в центре — эпителиоидные клетки, по перipherии — лимфоидные и гигантские клетки. Иногда в центре видны глыбки солей кальция. Для туберкулеза характерно образование вторичных узелков в зоне эпителиоидных клеток, для туберкулезной гранулемы — наличие зоны некроза, имеющей тенденцию к проникновению в специфическую капсулу.

### **При псевдотуберкулезе (*Corinebacterium pseudotuberculosis*):**

Основная форма поражения — казеозный лимфаденит. Лимфоузлы увеличены, плотной консистенции. Очаги некроза грязноватого или зеленоватого цвета. Содержимое — творожистой консистенции, легко вылущивается. Окружающая соединительнотканная капсула внутри имеет гладкую поверхность. Изменения локализуются в бронхиальных, средостенных, заглоточных и подчелюстных лимфоузлах, а также в легких.

В лимфатических узлах обнаруживают участки некроза с вкраплениями известки. Эти участки окружены мощной соединительнотканной капсулой, иногда гиалинизированной. Гигантские клетки отсутствуют. Процесс имеет тенденцию к купированию. Наряду с участками некроза в легких обнаруживают перибронхиальные лимфоидные инфильтраты, гиперплазию клеток альвеолярного эпителия, участки ателектаза.

### **При паратуберкулезе (*Mycobacterium paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*):**

Поражается подвздошная кишка и брыжеечные лимфоузлы. Слизистая кишечника бледно-серого цвета, утолщена и собрана в извилистые складки, которые при поглаживании не расправляются. Лимфоузлы увеличены, мозговидно набухшие, лишены зеленоватой пигментации, окружены рыхлой соединительной тканью. Казеозы в брыжеечных лимфоузлах редки и сочетаются с истощением животных. Слизистая оболочка кишечника инфильтрирована в основном эпителиоидными клетками, среди которых встречаются фибробlastы, гигантские и лимфоидные клетки. Ворсинки увеличены в объеме, деформированы.

### **При микотических поражениях (*Actinomices bovis*, бактерии Вольфа и Израеля, актинобактерия):**

Конгломераты гранулем в мощной фиброзной капсule, окрашенные в желтый цвет. В начальной стадии признаки катарально-гнойного воспаления: на разрезе жидкое содержимое без фибрина. Чаще выявляют в заглоточных, брыжеечных, реже в бронхиальных и средостенных лимфоузлах. В гранулеме обнаруживают друзы возбудителя, окруженные лейкоцитами, подвергающимися распаду, или клетками ретикулогистиоцитарной системы. При окраске гематоксилин-эозином друзы имеют розовый цвет. Основная часть гранулемы состоит из гистиоцитов, эпителиоидных и лимфоидных клеток. Встречаются также гигантские клетки Лангханса. Периферическая часть гранулемы состоит из волокнистой соединительной ткани.

### **При паразитарных поражениях (*Dityocaulus viviparous*, *D. filarial*, *muellerius capillaris*):**

Погибшие, неразвившиеся личиночные стадии паразитов, инкапсулированные и обызвествленные. Узелки одиночны, при разрезе центральный некроз легко вылущивается, поэтому внутренняя поверхность капсулы гладкая, блестящая. В брыжеечных лимфоузлах узелки имеют зеленоватый центр. В печени и легких они лежат одиночно, не образуя конгломератов и не имея перифокального воспаления. Паразитарную гранулему дифференцируют микроскопически.

При гистологическом исследовании в центре ее виден обычно сам паразит (или личинка), окруженный эозинофилами, нейтрофилами и лимфоидными клетками.

### **При абсцессах (стафилококки, стрептококки, гонококки, менингококки):**

Очаговое гнойное воспаление, характеризующееся образованием полости, заполненной гноем. Локализация и величина различны. Как правило, они одиночны, одевающая их капсула мощная, в старых абсцессах — гиалинизированная. На разрезе содержимое сметанообразной или жидкой консистенции желтоватого или зеленоватого цвета, нередко с зернами извести. Внутренняя поверхность капсулы гладкая, блестящая. Снаружи оболочка абсцесса состоит из соединительнотканых волокон, а внутри образована грануляционной тканью и сгущенным гноем. Гнойное воспаление характеризуется наличием в экссудате большого количества белка и лейкоцитов.

### **При новообразованиях (ДНК-, РНК- содержащие вирусы, физико-химические факторы и др.):**

Новообразования саркоматозного и аденооматозного типа при локальных поражениях иногда трудно отличить от сходных по патоморфологическому проявлению заболеваний. За небольшим исключением, опухоли построены по типу органа, то есть имеют паренхиму и стromу.

Обнаружение характерных для туберкулеза изменений у убитых с диагностической целью животных является основанием для установления диагноза на туберкулез. При обнаружении туберкулезоподобных изменений необходимо проводить дальнейшее лабораторное исследование патологического материала от убитых с диагностической целью животных, а также культур выделенных микобактерий и биоматериала от зараженных морских свинок [45].

**Диагностика.** При диагностике туберкулеза у крупного рогатого скота используют эпизоотологический, клинический,

аллергический, патологоанатомический, гистологический, бактериологический и молекулярно-генетический (полимеразная цепная реакция — ПЦР) методы исследований [27].

**Эпизоотологические данные.** Контроль за эпизоотическим состоянием хозяйств по туберкулезу животных осуществляют по результатам ветеринарно-санитарной экспертизы убойного скота на мясокомбинатах и в хозяйствах, патологоанатомического вскрытия трупов павших животных, регулярного клинического обследования поголовья и аллергических исследований, проводимых по эпизоотологическим и эпидемиологическим показаниям.

В результате анализа эпизоотической ситуации по туберкулезу крупного рогатого скота, выявляемого при убое животных, установлено, что болезнь в России начали регистрировать в 1889 году. Выяснение эпизоотической ситуации методом поголовного исследования стад животных внутрекожной туберкулиновой пробой проводят с 1951 года, что послужило началом широкомасштабных мероприятий по борьбе с туберкулезом крупного рогатого скота.

На 01.01.1951 было зарегистрировано 9833 неблагополучных пункта. Внедрение в ветеринарную практику основных положений утвержденных оздоровительных мероприятий позволило значительно снизить проблему туберкулеза крупного рогатого скота. Так, на 01.01.2018 в Российской Федерации оставалось 12 неблагополучных пунктов, на 01.01.2019 — 10, на 01.01.2020 — 13 неблагополучных пунктов [17].

**Клинический осмотр.** Клинический метод диагностики имеет ограниченное значение, так как применительно к крупному рогатому скоту удается выделить незначительное количество больных туберкулезом животных. При клиническом осмотре животного опре-

деляют внешний вид и упитанность, прощупывают поверхностные лимфатические узлы — подчелюстные, предлопаточные, надколенные, у коров — вымя и надвыменные лимфатические узлы. Клинические признаки болезни проявляются только при длительном течении процесса.

**Аллергическое исследование.** Прижизненная диагностика туберкулеза у крупного рогатого скота проводится аллергическим методом. Сущность метода заключается в выявлении животных, инфицированных возбудителем туберкулеза или другими микобактериями, в аллергической пробе с туберкулином.

Основным методом исследования крупного рогатого скота является внутрикожная туберкулиновая проба. В настоящее время в России для аллергической диагностики применяют внутрикожную пробу с туберкулином очищенным (ППД) для млекопитающих в дозе 2000 международных единиц (МЕ) в 0,2 мл. МЕ — единица активности Международного стандарта туберкулина, принятого Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

Туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих представляет собой очищенную белковую фракцию, выделенную из культурального фильтрата возбудителя туберкулеза бычьего вида, выращенного на синтетической питательной среде [9].

На туберкулин для млекопитающих реагирует крупный рогатый скот, зараженный возбудителями туберкулеза бычьего или человеческого видов. При этом у животных старых, а также с низкой упитанностью или при генерализованном туберкулезном процессе реакции на аллерген могут быть выражены слабо или даже отсутствовать (анергия).

В качестве дополнительных методов исследования применяют офтальмопробу, пальпебральное и внутривенное

введение туберкулина, симультанную пробу с туберкулином очищенным (ППД) для млекопитающих и аллергеном очищенным комплексным из атипичных микобактерий (КАМ) или с туберкулином очищенным (ППД) для млекопитающих и туберкулином очищенным (ППД) для птиц.

Следует отметить, что в последние годы при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота возрастает актуальность проблемы неспецифических реакций на туберкулин, так как в благополучных по туберкулезу хозяйствах РФ выявляется более 90% реагирующих животных.

В стране сложилась ситуация, когда количество реагирующих животных в благополучных хозяйствах более чем в 9 раз превышает количество таковых в неблагополучных хозяйствах. Опасаясь пропустить туберкулез, во многих хозяйствах всех реагирующих животных сдают на убой, что приводит к значительному ущербу.

Кроме того, все чаще регистрируются случаи проявления неспецифических реакций на туберкулин в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах, то есть увеличивается проявление так называемой смешанной микобактериальной инфекции.

Для внутрикожного введения туберкулина используют безыгольные инъекторы или шприцы с иглами для внутрикожных инъекций. Крупный рогатый скот подвергают туберкулинизации с двухмесячного возраста. Коров (нетелей) исследуют независимо от периода беременности.

Не разрешается туберкулинизировать животных в течение трех недель после вакцинации против инфекционных болезней или обработок против гельминтов.

Туберкулин вводят крупному рогатому скоту (кроме быков) в среднюю треть шеи (в этой области не разрешается вво-

дить другие лекарственные средства), быкам — в подхвостовую складку). Учет и оценку реакции у крупного рогатого скота проводят через 72 часа после введения аллергена.

В неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота пунктах допускается применение двойной туберкулиновой пробы. Животным, не реагировавшим на первое введение туберкулина, аллерген вводят повторно в день учета реакции в той же дозе и в то же место. Учет реакции на второе введение туберкулина проводят через 24 часа.

Крупный рогатый скот (кроме быков) считают реагирующим на туберкулин при утолщении кожной складки на 3 мм и более независимо от характера припухлости (отечности, болезненности, повышения местной температуры), быков — при образовании припухлости в месте введения туберкулина.

Следует отметить, что туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих — достаточно активный диагностический препарат, и его необходимо применять однократно. Реакции на повторное введение туберкулина, как правило, являются неспецифическими. Однократное внутрикожное введение аллергена в дозе 2000 МЕ в 0,2 мл предотвращает необоснованный убой значительного количества здоровых животных. Кроме того, вдвое сокращается труд ветеринарных специалистов и расход туберкулина [26].

Симультанную аллергическую пробу применяют для дифференциации специфических и параспецифических реакций при первичной постановке диагноза у крупного рогатого скота, а также для контроля за благополучием животных по туберкулезу в хозяйствах:

— с туберкулином очищенным (ППД) для млекопитающих и аллергеном очищенным комплексным из атипичных микобактерий (КАМ), где

реакции на туберкулин обусловлены сенсибилизацией нетуберкулезными микобактериями;

— с туберкулином очищенным (ППД) для млекопитающих и с туберкулином очищенным (ППД) для птиц, где реакции на туберкулин обусловлены сенсибилизацией микобактериями комплекса авиум-интрацеллюляре.

Проведение симультанной пробы допускается не ранее чем через 30 дней после последней туберкулинизации животных [33, 35].

Офтальмопробу у крупного рогатого скота можно применять только одновременно с внутрикожной туберкулиновой пробой в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах для дополнительного выявления зараженных животных, а также при отборе животных для диагностического убоя. Наиболее часто диагноз на вскрытии подтверждается у животных, реагирующих одновременно на внутрикожную пробу и офтальмопробу.

Внутрикожную туберкулиновую пробу применяют с целью отбора животных для диагностического убоя из числа реагирующих на туберкулин в благополучных по туберкулезу стадах.

Пальпбральный метод туберкулинизации крупного рогатого скота применяют одновременно с внутрикожной туберкулиновой пробой для дифференциации специфических и параспецифических реакций при первичной постановке диагноза. На эту пробу реагируют только животные, зараженные возбудителями бычьего или человеческого видов.

По данным А.Х. Найманова и соавт., на территории Российской Федерации ветеринарные лаборатории выделяют от реагировавших на туберкулин животных нетуберкулезные микобактерии, которые по классификации Раньона в процентном отношении распределяются следующим образом: I группа — 2,0%; II группа — 19,7%; III группа — 16,8%;

IV группа — 59,5%. В связи с этим ведутся разработки включения в состав КАМ быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий из IV группы по Раньону. Было установлено, что наибольшими сенсибилизирующими свойствами обладают *M. fortuitum* и *M. smegmatis* [26].

**Патологоанатомическое исследование.** При патологоанатомическом исследовании крупного рогатого скота на туберкулез обязательному осмотру подвергают заглоточные, подчелюстные, предлопаточные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные, порталные, надвывеменные лимфатические узлы, легкие, печень, селезенку, молочную железу, плевру, брюшину, кишечник.

Туберкулезом могут поражаться любые органы и ткани (кроме роговых тканей) животных. У взрослого крупного рогатого скота чаще всего поражаются легкие, лимфатические узлы головы и легких, у молодняка — брыжеечные лимфатические узлы.

При заражении крупного рогатого скота микобактериями туберкулеза человеческого и птичьего видов патологоанатомические изменения обнаруживают редко.

В случае отсутствия у крупного рогатого скота видимых изменений или при возникших затруднениях в определении характера патологических изменений послеубойный материал направляют для лабораторного исследования.

**Бактериологическое исследование** биоматериала включает бактериоскопический, культуральный и биологический методы и заключается в выделении культур микобактерий и определении вида возбудителя туберкулеза.

Бактериоскопию проводят в целях индикации в биоматериале кислотоустойчивых микобактерий. Этот метод может быть использован как для при жизни диагностики туберкулеза (микроскопия молока, фекалий, бронхиальной

и носовой слизи), так и для посмертной (исследование суспензии из патологического материала или мазков-отпечатков из органов и лимфатических узлов). Однако возможности бактериоскопии ограничены.

Световая микроскопия дает положительные результаты при минимальном содержании не менее 100 тыс. микобактерий в 1 мл биологического материала [11].

Бактериоскопическое исследование не позволяет дифференцировать различные виды микобактерий, а только указывает на их наличие в исследуемом материале. Различную степень кислотоустойчивой окраски можно наблюдать не только у микобактерий, но и у других микроорганизмов (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella*, цисты *Cryptosporidium* и *Isospora*). Поэтому на основании микроскопического исследования можно сделать предварительное заключение о наличии или отсутствии в исследуемом материале кислотоустойчивых микобактерий.

Микроскопическое выявление микобактерий основано на их характерном свойстве кислотоустойчивости, в связи с чем они окрашиваются в красный цвет при окраске по методу Циля–Нильсена.

Более чувствительным является метод люминесцентной микроскопии, который заключается в способности липидов микобактерий взаимодействовать с флуорохромами и при последующем облучении ультрафиолетовыми лучами излучать световые волны. Установлено, что этот метод особенно ценен при исследовании малоинфицированного материала. Однако при бактериоскопии возможно получение большого количества ложноположительных результатов по причине контаминации иммерсионного масла, предметных стекол или флаконов микобактериями [11].

Однако положительные результаты бактериоскопии не дают основания

для постановки диагноза на туберкулез и должны быть подтверждены культуральным, биологическим или молекулярно-генетическим методами исследования.

**Культуральное исследование.** В основе культурального исследования лежит способность микобактерий размножаться на искусственных питательных средах. Преимуществом этого метода является возможность получить изолят возбудителя, который может быть идентифицирован и изучен.

Патогенные микобактерии являются биохимически слабоактивными, содержат сравнительно мало ферментов и ростовых веществ, о чем свидетельствует их медленный и скучный рост и потребность в многокомпонентных питательных средах. Время репродукции популяции микробных клеток микобактерий составляет 18–24 ч., в то время как у других бактерий это занимает несколько минут [38, 39].

Культуральный метод выявления микобактерий обладает рядом преимуществ по сравнению со световой и люминесцентной микроскопией и дает положительные результаты при наличии 20–100 микобактерий в 1 мл исследуемого материала. С использованием этого метода на специальных питательных средах получают культуру микобактерий, проводят ее идентификацию, определяют вирулентность, биологические, биохимические и другие свойства, а также профиль молловых кислот и генетических маркеров.

Поскольку микобактерии являются медленнорастущими микроорганизмами, то для получения культуры на плотной питательной среде уходит от 3 до 12 недель с момента поступления биоматериала в лабораторию.

Результативность культурального метода исследования на туберкулез во многом зависит от качества взятия био-

логического материала, метода консервирования, транспортировки, условий и сроков хранения, предпосевной обработки, используемых питательных сред.

Основными требованиями к химическим веществам для обработки диагностического материала являются устойчивое подавление жизнедеятельности посторонней микрофлоры и отсутствие губительного влияния на микобактерии. Для обработки отобранного материала для исследования используются метод Гона–Левенштейна–Сумиоши, метод А.П. Аликаевой, метод флотации и др.

Основную роль при культуральном методе исследования на туберкулез играют свойства специальных питательных сред. Для культивирования микобактерий используют плотные, жидкие и полужидкие питательные среды; по композиционному составу — синтетические и полусинтетические.

Широкое применение в практике получили плотные питательные среды, имеющие сложный композиционный состав — Hohna, Stonebrink, Левенштейна–Йенсена, ФАСТ-ЗЛ, Финн-2, Гельберга, Петраньяни [27].

Следует отметить, что продолжаются работы по усовершенствованию методов предпосевной обработки биоматериала и созданию оптимальных вариантов питательных сред для выделения микобактерий [5, 42, 46].

**Биологическое исследование.** Метод биологической пробы применяют для индикации микобактерий туберкулеза в исследуемом биоматериале и идентификации культур возбудителя по патогенным свойствам для лабораторных животных. Индикацию возбудителя туберкулеза в биологическом материале проводят параллельно с культуральным исследованием методом подкожного введения посевной суспензии трем морским свинкам.

Идентификацию микобактерий проводят путем введения первичных культур трем морским свинкам, трем кроликам и, при необходимости, трем курам. За животными ведут наблюдения в течение трех месяцев.

Культуры бычьего вида вызывают генерализованный туберкулезный процесс у кроликов и морских свинок в сроки от 3 недель до 2–3 мес. Заражение культурами человеческого вида вызывает в сроки от 4 недель до 2–3 мес. генерализованный процесс с летальным исходом у морских свинок и не сопровождается прогрессирующим заболеванием у кроликов, которые могут жить месяцами, не проявляя видимых признаков болезни. Культуры микобактерий птичьего вида приводят в течение 11–30 дней к гибели кроликов от септического туберкулеза, в отдельных случаях у кроликов развивается местный туберкулезный процесс в органах, у морских свинок — абсцессы в месте введения культуры.

Биологическая проба является наиболее достоверным методом лабораторной диагностики туберкулеза. Разработан ускоренный способ проведения биологической пробы, обеспечивающий сокращение срока постановки диагноза на туберкулез: на морских свинках [4, 34, 41], белых мышах [14], перепелах и карликовых кроликах [6].

**Гистологическое исследование** проводят для дифференциации патологоанатомических изменений, типичных для туберкулеза, и сходных изменений, наблюдавшихся при других болезнях.

В положительных случаях при гистологическом исследовании в тканях находят гранулемы с некротизированным центром, окруженные зоной эпителиоидных, отдельных гигантских и лимфоидных клеток и соединительнотканной капсулой. В специфической капсуле, как правило, формируются дочерние резорбтивные узелки.

При дифференциальной диагностике следует учитывать гранулемы, образующиеся при актиномикозе, нокардиозе, коринебактериозе, паразитарных поражениях, паратуберкулезе.

В гранулемах микотического происхождения находят в некрозе мицелий гриба, при паразитарных — тело паразита и эозинофильноклеточную пролиферацию в капсule. При паратуберкулезе наблюдают в брыжеечных лимфатических узлах и кишечной стенке эпителиоидно-клеточную пролиферацию без образования некроза.

Таким образом, классические мицробиологические методы диагностики туберкулеза обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, но тем не менее являются длительными, трудоемкими и недостаточно эффективными.

**Молекулярно-генетический метод исследования (ПЦР).** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является молекулярно-генетическим экспресс-методом исследования, основанным на обнаружении в исследуемом материале специфического фрагмента ДНК, характерного только для определенного вида возбудителя. Считается, что метод ПЦР позволяет получить положительный результат при наличии в исследуемом материале единичных клеток возбудителя.

В научной литературе имеются сообщения об успешном применении ПЦР при диагностике многих инфекционных болезней, в том числе и об изучении возможности применения ПЦР при диагностике туберкулеза животных [13, 23, 24, 26, 29, 31, 42, 44].

В настоящее время в ветеринарной лабораторной практике используют гибридизационно-флуоресцентный метод детекции продуктов ПЦР, получивший название Real-time PCR. Модифицированный метод, в отличие от классической ПЦР, имеет ряд преиму-

ществ: количественное определение ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале, определение двух и более видов возбудителя в ходе одной реакции, более высокая чувствительность, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов, отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом уменьшить число ложно-положительных результатов.

ПЦР применяют при постановке диагноза на туберкулез у крупного рогатого скота при отсутствии видимых изменений или возникших затруднениях в определении характера патологоанатомических изменений, а также для определения видовой принадлежности выделенных микобактерий.

Положительный результат ПЦР свидетельствует о наличии в исследуемых образцах биоматериала от крупного рогатого скота или образцах выделенной культуры ДНК определенного вида возбудителя туберкулеза (*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*).

Отрицательный результат анализа указывает на отсутствие ДНК возбудителя туберкулеза в исследуемых образцах биоматериала от животных или образцах выделенной культуры.

Следует особо отметить, что при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота выделение возбудителя туберкулеза, тем более его ДНК, не может являться основанием для установления диагноза, так как даже при выделении возбудителя необходимо доказать его патогенность для чувствительных к заражению туберкулезом лабораторных животных (из-за возможного наличия L-форм *M. bovis* и *M. tuberculosis*).

Поэтому диагностика туберкулеза крупного рогатого скота должна быть комплексной, а метод ПЦР может использоваться как дополнительный лабо-

раторный экспресс-метод в целях идентификации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* от других видов нетуберкулезных микобактерий, а также при исследовании патологического материала от убитых с диагностической целью животных.

При оздоровлении неблагополучных по туберкулезу хозяйств метод ПЦР можно использовать для проверки контроля качества проведенной дезинфекции животноводческих помещений и объектов внешней среды на наличие ДНК возбудителей туберкулеза.

**Иммунодиагностические методы.** Известно, что при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота большое значение имеют иммунодиагностические методы, направленные на оценку функциональной активности Т-лимфоцитов, так как при инфицировании млекопитающих *M. bovis* доминирующим является клеточный иммунный ответ. Дальнейшие исследования по изучению туберкулеза человека, крупного рогатого скота и других видов животных подтвердили эту концепцию [49, 53].

Основным диагностическим методом оценки Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезе являются внутрикожная туберкулиновая пробы (ВТП), реакция бласттрансформации лейкоцитов (РБТЛ) и «сэндвич»-ИФА на основе моноклональных антител, предназначенный для выявления  $\gamma$ -интерферона ( $\gamma$ -ИФН) в крови инфицированных животных ( $\gamma$ -ИФН ИФА). Все эти методы предполагают использование туберкулина (ППД) в качестве антигена, стимулирующего пролиферацию Т-клеток *in vivo* (ВТП) или *in vitro* (РБТЛ и  $\gamma$ -ИФН ИФА).

Высокая чувствительность и специфичность  $\gamma$ -ИФН ИФА была подтверждена при проведении диагностических исследований в США, Ирландии, Испании, Аргентине, Бразилии и других странах мира [47, 48, 50, 51, 52].

В нашей стране также были проведены исследования этого метода при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота [7, 8, 20, 22, 37].

Установлено, что метод, предназначенный для детекции  $\gamma$ -ИФН в пробах крови крупного рогатого скота, характеризуется чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов.

Основным и существенным недостатком метода  $\gamma$ -ИФН ИФА является необходимость исследования свежей крови (в течение 24 ч. после взятия) и относительная дороговизна проведения исследований по сравнению с внутрикожной туберкулиновой пробой.

Таким образом,  $\gamma$ -ИФН ИФА целесообразно использовать как дополнительный метод при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота в целях дифференциации неспецифических реакций на туберкулин.

**Специфическая профилактика.** Попытки создания средств иммунизации против туберкулеза начались непосредственно после открытия в 1882 году Р. Кохом возбудителя болезни.

Для этой цели предлагались различные варианты иммунизаций: туберкулинами, микобактериями, убитыми физико-химическими методами, живыми ослабленными вирулентными микобактериями, бово-вакцинация или дженерализация Берингга, «Таурман» Р. Коха, иммунизация культурами микобактерий, ослабленных пассажем через организм холоднокровных, вакцина С. Арлуэна, иммунизация с *M. avium*, микобактериями, выделенными из холоднокровных, сенсибилизованными микобактериями, эмульсией из лимфатических узлов, методом Брускеттини, методом Валле, методом К. Шига, методом Феррана, живыми вирулентными микобактериями. Однако эти попытки не увенчались успехом [26].

Наиболее известная вакцина против туберкулеза человека — BCG (Bacillus Calmette-Guerin) была создана в 1921 году. В течение 13 лет после 230 пассажей на картофельно-глицериновой среде с желчью культуры *M. bovis* авторы получили уже ослабленную живую культуру, безвредную для морских свинок, кроликов, обезьян и крупного рогатого скота, но обладающую достаточными иммунизирующими свойствами.

Экспериментальными исследованиями было доказано, что вакцинацией BCG можно вызвать устойчивость организма животных к вирулентному возбудителю туберкулеза. Эти же исследования показали полную безвредность вакцины для всех восприимчивых к туберкулезу млекопитающих и птиц.

В нашей стране возможность использования вакцины BCG для иммунизации молодняка крупного рогатого скота изучали многие исследователи. Результаты проведенных исследований противоречивы, но тем не менее все авторы признают, что у иммунизированных телят применение BCG в качестве профилактического средства не наносит вреда животным, создает относительный иммунитет у 60–87% животных и сокращает сроки оздоровительных мероприятий в неблагополучных хозяйствах [2, 18, 28].

Имеются сообщения о возможности повышения иммунизирующих свойств вакцины BCG. Н.А. Донченко считает, что совместное применение вакцины BCG и иммуностимуляторов РНК (полириботана и ридостина) повышает у животных клеточный и гуморальный иммунитет, способствует увеличению иммуногенности вакцины и препятствует заражению возбудителем туберкулеза [12].

Однако иммунизированные животные, как правило, реагировали на туберкулин. Отсутствие методов диф-

ференциации поствакцинальной и инфекционной аллергии приводило к длительной потере контроля за состоянием иммунизированного поголовья. Поэтому изыскание возможности дифференциации поствакцинальных и инфекционных реакций являлось актуальной проблемой.

Полученные результаты исследований свидетельствуют, что иммунизированные BCG телята реагируют на туберкулин (ППД) для млекопитающих в различных разведениях, на туберкулин (ППД) для птиц, КАМ, BCG-тест и пальпебральную пробу примерно так же, как и зараженные туберкулезом животные в неблагополучных хозяйствах, и что использование вакцины BCG в комплексе профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулёзе крупного рогатого скота не обладает достаточной эффективностью [26].

Таким образом, вакцина BCG не нашла применения в широкой ветеринарной практике ни в одной стране мира. Кроме того, согласно рекомендациям МЭБ, вакцинация BCG затрудняет оценку результатов туберкулинизации и других иммунологических тестов и не принимается в странах, в которых для контроля благополучия по туберкулезу животных и международной торговли используются подобные тесты. Допускается иммунизация только диких животных в резервуарах инфекции с целью сокращения распространения *M. bovis*.

В связи с этим в действующих нормативных документах также не предусмотрено применение средств специфической профилактики туберкулеза крупного рогатого скота. Поэтому основой профилактических и оздоровительных мероприятий по туберкулезу была и остается диагностика этой болезни. Оздоровление неблагополучных по туберкулезу стад крупного рогатого скота проводят методами:

– систематических диагностических исследований с выделением больных животных и последующим их убоем (где предусмотрено и изолированное выращивание телят);

– единовременной полной заменой неблагополучного стада здоровыми животными [27, 38].

Тем не менее есть основание предполагать, что в недалеком будущем появится новая более эффективная вакцина против туберкулеза крупного рогатого скота из генно-модифицированного штамма *M. bovis* BCG.

**Химиотерапия и химиопрофилактика.** Эпизоотологические особенности туберкулеза, экономические затраты и требуемые условия для осуществления терапии болезни у крупного рогатого скота не позволяют широко использовать ее в ветеринарной практике, так как при развивающемся процессе туберкулеза, к сожалению, нельзя рассчитывать на терапевтический эффект.

Специалисты Комитета экспертов ФАО/ВОЗ еще в 1969 г. утверждали, что в районах, где имеется возможность применять классические методы исследований и убоя больных животных, нет никакой необходимости применять химиотерапию и химиопрофилактику.

В связи с тяжелой эпизоотической ситуацией по туберкулезу крупного рогатого скота в инструкции «О мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза животных», утвержденной ГУВ МСХ СССР, Главным управлением карантинных инфекций и Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Минздрава СССР в 1983 году, было указано: «В качестве средств специфической или неспецифической защиты от заболевания туберкулезом животных в комплексе мер по профилактике и ликвидации туберкулеза допускается применение противотуберкулезной вакцины и химических препаратов. Обработки жи-

вотных противотуберкулезной вакциной и химическими препаратами разрешается проводить только в случаях и порядке, установленном ГУВ МСХ СССР».

Однако в следующей инструкции «О мероприятиях по профилактике и ликвидации туберкулеза животных», утвержденной ГУВ с Госветинспекцией Госагропрома СССР и Минздравом СССР в 1988 году, пункты о возможности применения противотуберкулезных вакцин и химических препаратов были исключены.

В нашей стране вопросы химиопрофилактики и целесообразности её применения в системе мер борьбы и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота изучали многие исследователи начиная со второй половины XX века.

Были проведены экспериментальные исследования и комиссионные испытания основных химиотерапевтических средств, используемых в ветеринарии. Полученные результаты исследований показали, что пероральное и подкожное применение тубазида и суспензии тубазида подавляет проявление аллергических реакций на туберкулин у зараженного туберкулезом крупного рогатого скота [1, 15, 19].

Кроме того, бесконтрольное применение в ветеринарной практике изониазида и его вариантов, а также других противотуберкулезных препаратов увеличивает количество лекарственно устойчивых микобактерий туберкулеза в организме животных и в окружающей среде. При этом, как правило, не изучается лекарственная устойчивость *M. bovis*, не проводятся углубленные поиски персистирующего возбудителя в организме животных после профилактического лечения, не изучается его морфология, вирулентность и концентрация препарата в крови.

При заражении людей, в частности детей, такими микобактериями туберкулеза последующая химиопрофилак-

тика их изониазидом будет неэффективной. Л.А. Лазовская указывает, что высокий уровень заболеваемости детей туберкулезом отягощается обнаружением в половине случаев первичной лекарственной устойчивости микобактерий, а у 20–22% детей — множественной лекарственной устойчивости [16].

## Литература

1. Асташова Е.А., Овдиенко Н.П., Красота Л.А. и др. Влияние тубазида на течение туберкулезного процесса и L-трансформацию *M. bovis* у подопытных телят. Труды ВИЭВ. 2003; 73: 97–107.
2. Бажин М.А., Смоляников Ю.И., Ощепков В.Г., Кощеев Н.Н., Новиков А.Н., Власенко В.С., Куварин А.С. Вакцинопрофилактика в комплексе противотуберкулезных мероприятий. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 139–142.
3. Бакулов И.А. Проявление эпизоотического процесса и оценка его эффективности. Руководство по общей эпизоотологии. Под ред. И.А. Бакурова и А.Д. Третьякова. М.: Колос, 1979; 137–148.
4. Боганец Н.С. Бактериологическая диагностика туберкулеза животных и ее усовершенствование: автореф. дис. ...д-ра вет. наук. Омск, 2006; 38.
5. Боганец Н.С., Свириденко Н.А., Аппельганец Л.Т. Новые возможности повышения бактериологической диагностики туберкулеза животных. Ветеринарная медицина. 2013; 1–2: 14–16.
6. Бушмелева П.В. Новые экспериментальные модели для биологической пробы при диагностике туберкулеза сельскохозяйственных животных: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2011; 20.
7. Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.Х. Использование метода «Сэндвич»-ИФА для диагностики ту-

- беркулеза крупного рогатого скота. Сб. науч. трудов ВНИИБТЖ. Омск. 2001; 173–175.
8. Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.А. Динамика содержания  $\gamma$ -интерферона в крови крупного рогатого скота при туберкулезе. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 121–123.
9. Воронин Е.С., Бессарабов Б.Ф., Вашутин А.А. Инфекционные болезни животных. М.: КолосС, 2007; 671.
10. ГОСТ 32306-2013. Туберкулины очищенные (ППД) для животных. Технические условия.
11. Донченко А.С., Овдиенко Н.П., Донченко Н.А. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота. Новосибирск. 2004; 306.
12. Донченко Н.А. Усовершенствование средств и методов диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Новосибирск, 2008; 36.
13. Калмыков В.М. Использование полимеразной цепной реакции в целях мониторинга благополучия по микобактериальным инфекциям зоопарковых, цирковых и сельскохозяйственных животных. Автореф. дис ... канд. вет. наук. ВНИТИБП. 2013; 25.
14. Касьянова Е.А. Оптимизация комплекса видовой идентификации микобактерий. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2010; 13.
15. Красота Л.А. Результаты исследования на туберкулэз крупного рогатого скота, заражённого микобактериями *bovis* при применении тубазида. Бюллеть ВИЭВ. 1987; 64: 37–40.
16. Лазовская А.Л. Специфическая химиопрофилактика при туберкулэзе как антропозоонозе. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 154–156.
17. Муковнин А.А., Найманов А.Х., Гулюкин А.М. Туберкулез крупного рогатого скота в России. Ветеринария. 2020; 7: 19–23.
18. Найманов А.Х. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций крупного рогатого скота. Автoref. дис. ... д-ра вет. наук. М., 1993; 29.
19. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П. Влияние тубазида на проявление аллергических реакций на туберкулин. Конф. к 80-летию МВА «Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве». М., 1999; 30.
20. Найманов А.Х., Верховский О.А., Савицкая О.А. Диагностическое значение внутрикожной туберкулиновой пробы и  $\gamma$ -ИФН ИФА при туберкулезе крупного рогатого скота. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 118–121.
21. Найманов А.Х. Проблемы диагностики и профилактики туберкулэза крупного рогатого скота в современных условиях. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 18–23.
22. Найманов А.Х., Верховский О.А., Савицкая О.А. Определение  $\gamma$ -интерферона для диагностики туберкулэза. Ветеринария. 2004; 6: 19–22.
23. Найманов А.Х., Овдиенко Н.П., Осипова Е.П. и др. ПЦР при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Ветеринария. 2004; 1–2: 19–23.
24. Найманов А.Х., Калмыкова М.С., Осипова Е.П. Диагностическое значение ПЦР на современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота. Ветеринарная патология. 2009; 3(30): 33–39.
25. Найманов А.Х., Гулюкин М.И. Микобактериальные инфекции крупного рогатого скота (туберкулез, паратуберкулез). М.: ЗооВетКнига, 2014; 235.
26. Найманов А.Х., Калмыков В.М. Туберкулез животных (учебник для вузов, специальная литература). СПб.: Лань, 2018; 504.
27. Наставление по диагностике туберкулеза животных, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 18.11.2002. М., 2002; 64.

28. Новиков А.Н., Бажин М.А., Власенко В.С. Схема специфической профилактики туберкулеза крупного рогатого скота с применением БЦЖ и бесклеточной вакцины ТБЦМ. Матер. междунар. научн. конф., посвящённой 175-летию аграрной науки Сибири. Сб. научн. тр. Омск. 2003; 123–127.
29. Обухов И.Л., Букова Н.К., Клименкова О.В. Усовершенствование коммерческих ПЦР-тест-систем для диагностики туберкулеза животных. Ветеринарная патология. 2004; 1–2: 94.
30. Овдиенко Н.П., Найманов А.Х., Толстенко Н.Г. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях. Ветеринарный врач. 2009; 2: 14–17.
31. Осипова Е.П. Применение полимеразной цепной реакции для идентификации микобактерий и ее диагностическая значимость при туберкулезе крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004; 21.
32. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. СПб.: Медицинская пресса, 2005; 218.
33. Ощепков В.Г., Таллер Л.А., Овсянова Н.И. и др. О значении симультанной аллергической пробы при диагностических исследованиях крупного рогатого скота на туберкулез. Сб. науч. трудов ВНИИБТЖ. 2003; 20–26.
34. Ощепков В.Г., Таллер Л.А., Секин Е.Ю. и др. Ускоренная диагностика туберкулеза животных. Ветеринарная медицина. 2010; 94: 136–137.
35. Помыканов Н.П. Совершенствование диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в индивидуальных и общественных хозяйствах. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2005; 23.
36. Порываева А.П., Шкуратова И.А., Верещак Н.А. Эпизоотический процесс и патогенез туберкулеза крупного рогатого скота. БИО. 2017; 12(207): 15–18.
37. Савицкая О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2004; 24.
38. Санитарные и Ветеринарные правила «Профилактика и борьба с разными болезнями, общими для человека и животных. 10. Туберкулез», утв. Госкомсанэпиднадзором России 16.05.1996 и Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 18.06.1996.
39. Секин Е.Ю. L-трансформация микобактерий, свойства и способы культивирования L-форм. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Новосибирск, 2006; 18.
40. Семенов В.И. Латентная туберкулезная инфекция и ее роль в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Благовещенск, 2003; 20.
41. Смоляников Ю.И., Боганец Н.С., Панкратова А.Д. Метод ускоренной постановки биологической пробы на морских свинках в диагностике туберкулеза животных. Ветеринарная патология. 2004; 1–2: 115–118.
42. Таллер Л.А., Ощепков В.Г., Секин Е.Ю. и др. Совершенствование лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Достижения науки и техники АПК. 2011; 9: 67–69.
43. Тупота Н.Л., Ионина С.В., Донченко Н.А. и др. Диагностическая значимость различных методов выявления микобактерий. Ветеринария. 2010; 3: 56–58.
44. Шаров А.Н., Ерошенко Л.А., Суханов И.П. и др. Эффективность методов прижизненной диагностики туберкулеза. Ветеринария. 2002; 2: 16–18.
45. Якушева О.В., Суворов В.С., Колоскова Э.Л. К оценке патологоанатомических изменений в диагностике туберкулеза. Ветеринарная патология. 2004; 1–2: 79–80.

46. Янченко Т.А. Усовершенствование лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2011; 18.
47. Buddle B.M., Ryan T.J., Pollock J.M. et al. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.* 2001; 80(1): 37–46.
48. Katial R.K., Hershey J., Purohit Seth T. et al. Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of *in vitro* gamma interferon production in whole-blood culture. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8: 339–345.
49. Neill S.D., Cassidy J., Hanna J. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin-test negative cattle with an assay for bovine gamma interferon. *Vet. Record.* 1994; 135: 134–135.
50. Pollock J.M., Girvin R.M., Lightbody K.A. et al. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet. Rec.* 2000; 146(23): 659–665.
51. Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A. et al. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 1990; 67: 134–137.
52. Ryan T.J., Buddle B.M., De Lisle G.W. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.* 2000; 69: 57–61.
53. Wood P.R., Rothel J.S. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 1994; 40: 125–135.

# ПАРАТУБЕРКУЛЕЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Найманов А.Х., Букова Н.К.

**Определение болезни.** Паратуберкулез, паратуберкулезный энтерит, болезнь Йоне — хроническая инфекционная болезнь в основном жвачных животных, чаще всего протекающая латентно, характеризующаяся поражением кишечника и мезентериальных лимфатических узлов и, как следствие, сопровождающаяся расстройством желудочно-кишечного тракта (диареей) с прогрессирующими истощением, до летального исхода.

Паратуберкулез крупного рогатого скота впервые был описан A. Johne и L. Frothingham в 1895 году как особая форма туберкулеза кишечника, вызываемая ослабленным возбудителем туберкулеза бычьего или птичьего вида. В 1902 году Mc. Fadylan назвал эту болезнь в честь первооткрывателя — болезнью Йоне. В. Bang в 1906 году назвал болезнь хроническим псевдотуберкулезным энтеритом, так как ему не удалось заразить лабораторных животных патологическим материалом от больной коровы.

В 1912 году T.W. Twort, Y.Z. Ingram выделили возбудителя из подвздошной кишки больного крупного рогатого скота на искусственных питательных средах и назвали его *Mycobacterium enteritidis chronicae bovis*. Впоследствии возбудитель болезни, названной паратуберкулезом, был квалифицирован как *Mycobacterium paratuberculosis*. В 1990 году по предложению M.F. Thorel et al. возбудитель паратуберкулеза стал считаться подвидом микобактерий птичьего вида — *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) [29].

В России паратуберкулез крупного рогатого скота впервые обнаружил в 1911 году И.А. Гордзялковский, зарегистрировать болезнь начали с 1927 года.

578

По данным МЭБ, 15–20 лет назад паратуберкулез крупного рогатого скота обнаруживали более чем в 60 странах на всех континентах [15]. Паратуберкулез признан одной из самых серьезных болезней современности со значительными экономическими последствиями. Экономический ущерб слагается из снижения производства продукции животноводства, потери молочной продуктивности, бесплодия, истощения, выбраковки или гибели больного скота [2, 14].

Диагноз на паратуберкулез у животных устанавливают, руководствуясь следующими нормативными документами:

— Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации паратуберкулезного энтерита (паратуберкулеза) крупного рогатого скота, утв. ГУВ МСХ СССР 18.08.1975;

— Наставление по диагностике паратуберкулеза (паратуберкулезного энтерита) животных, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 05.04.2001.

**Этиология.** Возбудителем паратуберкулеза крупного рогатого скота является *Mycobacterium paratuberculosis* (или *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) рода *Mycobacteriaceae*, порядка *Actinomycetales*.

Генетическая связь *M. paratuberculosis* и *M. avium* была установлена на основании метода ДНК-ДНК-гибридизации. Показано, что гены *M. paratuberculosis* и *M. avium* на 99% гомологичны, что подтверждает ранее установленное близкое родство между двумя этими видами. Многие исследователи сообщали о почти 100%ной гомологии между большинством штаммов *M. paratuberculosis* и *M. avium*.

Возбудитель паратуберкулеза — самая мелкая из микобактерий, тонкая полиморфная неподвижная палочка с

закругленными концами, длиной 0,5–1,5 мкм, шириной 0,2–0,5 мкм, спор и капсул не образует, грамположительна, кислото-, щелоче-, спиртоустойчива, хорошо окрашивается по Цилю–Нильсену.

В мазках из фекалий больных животных, из сосковов слизистой оболочки пораженного участка кишечника и брызговых лимфатических узлов микобактерии паратуберкулеза расположены в виде частоколов, гнезд, реже попарно, по три и по четыре.

Возбудитель паратуберкулеза — obligатный паразит, вне организма животных не размножается, растет в аэробных условиях очень медленно, первичный рост появляется в диапазоне от 8–12 недель до 4–6 месяцев на специальных питательных средах (модифицированная казеиновая среда Любо–Смита, среды Данкина, Ренжера, Лонга, Генли и др.) с добавлением фактора роста — микобактерина (экстракта из *M. phlei*).

**Эпизоотология.** Паратуберкулез остается одной из недостаточно изученных, сложно контролируемых болезней. Инкубационный период может длиться от 6 месяцев до 15 лет. Латентно больные животные, не проявляя клинических признаков болезни, периодически выделяют возбудителя во внешнюю среду.

Проблему паратуберкулеза нередко сравнивают с «верхушкой айсберга» (айсберг-эффект), при этом один клинический случай соседствует с десятками случаев латентной формы инфицирования животных [2, 8, 10, 14].

Заражение животных, как правило, происходит в молодом возрасте через молоко, воду, а также объекты внешней среды, инфицированные выделениями больных животных, и зависит от времени и частоты повторных контактов, экспозиции, вирулентности возбудителя, его жизнеспособности, количества попавших в организм животного мико-

бактерий и естественной резистентности животных.

Установлено, что выделение возбудителя из организма зараженных животных происходит в основном с фекалиями, реже с мочой и молоком, которые загрязняют пастбища, водоемы, помещения, корма и другие объекты внешней среды [26]. Инфицированные коровы могут стать резервуаром инфекции для плода и новорожденных телят. Молоко, полученное от больных туберкулезом коров, может быть потенциально опасным и для людей [28].

Паратуберкулезом заражаются в основном телята в первые дни жизни и до 4-месячного возраста. Клиническая форма чаще проявляется у коров 3–5-летнего возраста, через 1,5–2 мес. после первого или второго отела, преимущественно в зимнее время. Болеют также быки и волы. Породных различий восприимчивости к паратуберкулезу не установлено. Летальность при паратуберкулезе может достигать 10–25%.

Предрасполагающими факторами возникновения и распространения паратуберкулеза являются: неудовлетворительное содержание и кормление животных; скармливание в больших количествах кислых кормов: барды, жома, силоса; минеральное голодание; глистные инвазии; переохлаждение или перегревание, снижающие общую резистентность организма. Болезнь чаще регистрируют в зонах с кислыми или солончаковыми почвами, так как в получаемых кормах содержится недостаточное количество фосфора и кальция [13].

Установлено, что за последние 30 лет в Российской Федерации широкого распространения паратуберкулеза среди крупного рогатого скота не регистрировалось: количество неблагополучных пунктов ежегодно колебалось от двух до шести в 15 субъектах — чаще всего в животноводческих хозяйствах Удмуртской

республики и республики Саха (Якутия).

В неблагополучных хозяйствах регистрация животных с клиническими проявлениями паратуберкулеза была единичной, а количество латентно больных, выявленных с помощью серологического и аллергического методов, не превышала 10–15% от общего поголовья. Таким образом, эпизоотический процесс заболевания крупного рогатого скота паратуберкулезом проходил хронически и без массового распространения.

**Патогенез.** Микобактерии паратуберкулеза проникают в макроорганизм алиментарным путем, через поврежденный эпителий в строму ворсинок тонких кишок и фагоцитируются ретикулярными клетками. Наличие на поверхности и в оболочке микробной клетки стеариновых кислот и других воскоподобных веществ препятствует перевариванию микобактерий при фагоцитозе, и их размножение осуществляется внутриклеточно, что способствует увеличению размеров фагоцитов. Ядро их размещается полярно. Пораженные макрофаги, объединяясь в клеточные скопления, приобретают вид эпителиоидных клеток. Под воздействием внутриклеточного размножения микобактерий происходит разрушение клеток, а свободившиеся микобактерии вновь фагоцитируются. Все это вызывает образование крупных скоплений микобактерий и пораженных макрофагов вначале в ворсинках, затем в глубоких слоях кишечной стенки и брыжеечных лимфатических узлах, что приводит к атрофии и характерным пролиферативным воспалениям.

Происходят стойкие нарушения ферментативных, секреторных и всасывающих функций кишечника, а также минерального, солевого и водного обменов. Развивается перемежающаяся, затем стойкая диарея, приводящая к значительному истощению и резкому

снижению молочной продуктивности. Иногда наблюдают бактериемию. В таких случаях возбудитель болезни проникает в лимфатические узлы, паренхиматозные органы, матку, плод и вымя.

**Клиническая картина.** При паратуберкулезе различают латентное или бессимптомное течение, когда процесс развивается и протекает скрыто, и клиническое течение, когда процесс обостряется, принимает быстрое течение и сопровождается клиническими признаками. При клиническом течении болезнь, как правило, заканчивается гибелью животного.

У многих латентно больных клинические признаки не проявляются годами, животные отстают в росте, теряют упитанность и молочную продуктивность. Наличие таких животных затрудняет проведение мероприятий по оздоровлению хозяйств от паратуберкулеза.

Клинически паратуберкулез у крупного рогатого скота характеризуется диареей, исхуданием, снижением молочной продуктивности.

Отмечается отек в подчелюстном пространстве и в области подгрудка, выцветание, жесткость волосяного покрова и потеря упругости кожи. В связи с тем, что жир глазных орбит исчезает, глаза западают в глазные впадины, затем появляется диарея, вначале перемежающаяся, затем стойкая, изнуряющая и постоянная. Фекалии жидкие, зеленоватого или коричневого цвета, содержат пузырьки газа, слизь, иногда следы крови и имеют неприятный запах.

Вследствие постоянных и сильных поступков позвоночник изгибается, сфинктер прямой кишки иногда парализуется и фекалии извергаются непроизвольно, в результате чего хвост, вымя и задние конечности загрязняются.

Животные теряют в весе, много лежат, встают с трудом. По мере развития болезни исхудание прогрессирует, удой все бо-

лее снижается до полного прекращения молокоотделения. Наблюдаются ухудшение аппетита до его полного отсутствия с сохранением и даже повышением жажды вследствие потери жидкости при диарее. Истощение ведет к атрофии мыши, особенно крупка (шилозадость). Повышения температуры тела не наблюдается, а перед гибелю животного она даже снижается. Обычно от начала проявления клинических признаков до смерти проходит 3–4 месяца.

#### **Патологоанатомические изменения.**

Патологоанатомические изменения при паратуберкулезе крупного рогатого скота в основном ограничиваются желудочно-кишечным трактом и брыжеечными лимфатическими узлами. Чаще всего эти изменения обнаруживают в заднем отделе тонкого кишечника, илеоцекальной заслонке, слепой кишке и начальном отрезке ободочной кишки.

Однако разные исследователи отмечают значительные колебания поражений различных отделов желудочно-кишечного тракта у больного паратуберкулезом крупного рогатого скота: съчуг — 50%; двенадцатиперстная кишка — 12,0–13,6%; тощая кишка — 68,2–96,0%; подвздошная кишка — 75,0–81,8%; слепая кишка — 32,0–36,3%; ободочная и прямая кишка — 31,8%; ободочная кишка — 4,0%; илеоцекальная заслонка — 76,0%; брыжеечные лимфатические узлы — 68,6%.

На вскрытии слизистая оболочка пораженных участков кишечника утолщена в 5–10 раз, а иногда и в 20 раз. Поражений на всем протяжении кишечника обычно не наблюдается, изменения чередуются со слабопораженными и неизмененными участками. На поперечном разрезе просвет кишечника сужен, на продольном заметна резко выраженная поперечная или продольная складчатость слизистой оболочки, напоминающая извилины мозга или

завитки каракуля, которые не расправляются при растягивании. Вершины складок гиперемированы или имеют полосчато-точечные кровоизлияния.

Солитарные фолликулы и пейеровы бляшки на слизистой оболочке хорошо выражены, брыжеечные лимфатические узлы, регионарные пораженным участкам кишок, увеличены, размягчены, отечны, иногда содержат серовато-белые саркомоподобные очаги, на разрезе серого цвета. Лимфатические сосуды брыжейки, идущие от кишечника к лимфатическим узлам в виде шнурков, утолщены и без жира. Иногда наблюдается утолщение стенок съчуга со складчатой слизистой оболочкой.

Утолщение и складчатость кишечника бывают даже у здоровых животных вследствие сокращения мышц в пустом отрезке кишечника. Поэтому патоморфологический анализ на паратуберкулез необходимо ставить только на основании гистологического исследования патологического материала [16, 18].

**Диагностика.** Для диагностики паратуберкулеза применяют комплексный метод прижизненного выявления и посмертного подтверждения болезни, включающий клинические, аллергические, серологические, бактериологические и патоморфологические исследования, с учетом эпизоотологических данных.

Следует отметить, что до настоящего времени не разработано достаточно эффективных средств для прижизненного выявления латентно больных животных [8].

В соответствии с Наставлением по диагностике паратуберкулеза (паратуберкулезного энтерита) животных для прижизненной диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота применяют бактериоскопию, серологический метод (РСК) и аллергическое исследование с туберкулином очищенным (ППД)

для птиц (с 6-месячного возраста). Реагирующими в аллергическом исследовании считают животных с утолщением кожной складки на 6 мм [1, 6].

Диагноз на паратуберкулез считается установленным:

- при наличии у животных характерных клинических признаков болезни и получении одновременно положительных результатов бактериоскопического или гистологического исследования биоматериала;
- при обнаружении характерных патологоанатомических изменений в кишечнике и мезентериальных лимфатических узлах с гистологическим или бактериоскопическим подтверждением паратуберкулеза, независимо от наличия или отсутствия клинических признаков болезни.

В неблагополучных по паратуберкулезу крупного рогатого скота хозяйствах больными считают животных:

- при слабо выраженных клинических признаках болезни, независимо от результатов аллергического и серологического исследований;
- при отсутствии клинических признаков, но совпадающих положительных результатах аллергического и серологического исследований [11].

Гистологическое исследование позволяет выявлять реакцию организма на воздействие возбудителя и поэтому точнее диагностировать наличие болезни [17, 18].

При гистологическом исследовании препаратов, изготовленных из пораженных участков кишечника и брыжеечных лимфатических узлов, обнаруживают в слизистой оболочке кишечника скопления эпителиоидных клеток в виде гранулем или располагающихся диффузно по всей толще оболочки, по краевым и центральным синусам брыжеечных лимфатических узлов — эпителиоидные клетки в виде

различной величины гранулем, которые при слиянии образуют сплошные поля. Среди эпителиоидных клеток довольно часто встречаются гигантские клетки. Обычно микобактерии паратуберкулеза, окрашенные в темно-красный цвет, фагоцитированы и находятся в эпителиоидных и гигантских клетках.

В пораженных отделах кишечника находят утолщенные, сливающиеся ворсинки, скопления микобактерий в ворсинках, а также в глубоких слоях кишечной стенки и брыжеечных лимфатических узлах.

С.С. Нестреляев указывает, что при гистологических исследованиях при паратуберкулезе находили пролифераты эпителиоидных клеток, располагающихся диффузно или в виде скоплений — гранулем в слизистой оболочке кишечника или подслизистом слое. Ворсинки слизистой оболочки увеличены, часто сливаются и имеют вид колбообразных вздутий. Некоторые ворсинки сдавлены или атрофированы [12].

Паратуберкулез крупного рогатого скота остается одной из сложно диагностируемых инфекций. Причины этого указывают А.Х. Найманов и соавт.:

- первичный рост возбудителя паратуберкулеза появляется через 8–12 недель на специальных питательных средах и только с добавлением фактора роста — микобактина;
- при микроскопии возбудитель паратуберкулеза невозможно отличить от других видов микобактерий ввиду идентичности окрашивания;
- возбудитель паратуберкулеза не патогенен для лабораторных животных, поэтому биопроба не применяется;
- при патологоанатомическом осмотре крупного рогатого скота, подозреваемого в заболевании, нормальная складчатость кишечника может быть принята за паратуберкулезные изменения.

В связи с этим разработка эффективных методов диагностики паратуберкулеза остается актуальной проблемой, при этом значительным препятствием является отсутствие биологической модели для воспроизведения болезни [9].

Многочисленные попытки в этом направлении не увенчались успехом, хотя имеется сообщение, что крольчаты 1-месячного возраста, по сравнению с мышами и морскими свинками, являются наиболее восприимчивыми к возбудителю паратуберкулеза [3].

В качестве новых методов диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота авторами упоминается иммуноферментный анализ, тест иммунодиффузии в агаровом геле, гамма-интерферонный анализ, использование фага, ДНК-зондов, возможность применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) [19, 27, 28].

Метод ПЦР предлагается использовать, как правило, как дополнительный метод: для идентификации культур микобактерий, выращенных на питательных средах; для исследования проб фекалий, крови или семени от подозреваемых в заболевании паратуберкулезом животных [5, 7, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

Паратуберкулез следует дифференцировать от туберкулезного энтерита, случаев отравления животных молибденом, от болезней, вызванных недостатком в рационе меди, от алиментарных энтеритов, стронгилоидоза, кокцидиоза.

При исключении алиментарных энтеритов учитывают данные анамнеза и симптоматического лечения. Стронгилоидоз и кокцидиоз исключают копрологическим исследованием, туберкулез — прижизненным аллергическим исследованием. Кроме того, при туберкулезе на вскрытии обнаруживаются поражения не только кишечника, но и легких, других органов и лимфатических узлов. При недостаточности меди отмечают

выпадение волос вокруг глаз и шаткость передвижения вследствие атаксии. Симптомы исчезают после введения в рацион солей меди.

**Специфическая профилактика.** У крупного рогатого скота, инфицированного паратуберкулезом, развиваются все типы иммунологических реакций: развитие гуморального и клеточного иммунитета, возникновение гиперчувствительности замедленного типа.

В мировой практике неоднократно предпринимались попытки создания как живых, так и аттенуированных вакцин против паратуберкулеза животных, однако ни одна из них не нашла массового применения. Причинами явились недостаточная эффективность и невозможность отличия вакцинированных животных от естественно инфицированных.

## Литература

- Головченко М.В. Сравнительная оценка эффективности аллергенов при диагностике паратуберкулеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2006; 29.
- Завгородний А.И., Позмогова С.А., Головко В.А. Парагельминтоз сельскохозяйственных животных. Ветеринарна медицина. 2010; 94: 171–173.
- Завгородний А.И., Позмогова С.А., Гирка М.А., Шутченко П.А., Медведь Е.А. Воспроизведение паратуберкулеза у экспериментально инфицированных *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) лабораторных животных. Ветеринарна медицина. 2014; 99: 19–24.
- Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации паратуберкулезного энтерита (паратуберкулеза) крупного рогатого скота. утв. ГУВ МСХ СССР 18.08.1975.
- Калмыков В.М. Использование полимеразной цепной реакции в целях

- мониторинга благополучия по микобактериальным инфекциям зоопарковых, цирковых и сельскохозяйственных животных. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 2013; 25.
6. Найманов А.Х. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М., 1993; 29.
7. Найманов А.Х., Калмыков В.М. ПЦР при диагностике паратуберкулеза крупного рогатого скота. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2012; 3: 30–32.
8. Найманов А.Х., Гюлюкин М.И. Микобактериальные инфекции крупного рогатого скота (туберкулез, паратуберкулез). М.: ЗооВетКнига, 2014; 235.
9. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П. и др. Проблемы диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление. 2014; 3: 10–12.
10. Найманов А.Х., Вангели Е.П., Толстенко Н.Г. Паратуберкулез крупного рогатого скота. LAP LAMBERT Academic Publishing RU. 2020; 47.
11. Наставление по диагностике паратуберкулеза (паратуберкулезного энтерита) животных. утв. Департаментом ветеринарии МСХ РФ 05.04.2001.
12. Нестреляев С.С. Особенности патоморфологического метода диагностики при паратуберкулезе животных. Труды ВИЭВ. 2013; 77: 125–133.
13. Овдиенко Н.П. Эпизоотология паратуберкулеза крупного рогатого скота и оценка мероприятий, проводимых при этом заболевании. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 1971; 24.
14. Овдиенко Н.П., Найманов А.Х., Толстенко Н.Г. и др. Профилактика и меры борьбы с паратуберкулезом животных. Ветеринария. 2007; 12: 3–7.
15. Шуляк Б.Ф. 110 лет со дня открытия возбудителя паратуберкулеза. Рос- сийский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2005; 3: 3–5.
16. Щуревский В.Е. Патологическая анатомия паратуберкулеза у крупного рогатого скота, овец и коз в зависимости от показаний аллергии и РСК. Труды ВИЭВ. 1965; 31: 88–102.
17. Щуревский В.Е. Патологическая анатомия, вопросы патогенеза и патоморфологическая характеристика аллергии и РСК при диагностике паратуберкулеза сельскохозяйственных животных. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М., 1966; 17.
18. Щуревский В.Е. Паратуберкулез сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1971; 128.
19. Alinori C.A., Ward M.P., Lin Tsang Long et al. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Veterinary Microbiology. 2009; 136(1/2): 177–179.
20. Buergelt C.D., Donovan G.A., Williams J.E. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in blood and semen of a bull with clinical paratuberculosis. Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. 2004; 2: 130–134.
21. Doosti A., Moshkelani S. Application of IS900 nested-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from faecal specimens. Bulg. J. Veter. Med. 2010; 13(2): 92–97.
22. Englund S., Bolske G., Ballagi-Pordany A. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. J. Veterinary Microbiology. 2001; 81(3): 257–271.
23. Herthnek D., Englund S., Willemse P.T.J., Bolske G. Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. J. of Applied Microbiology. 2006; 100: 1095–1102.

24. Jaravata C.V., Smith W.L., Rensen G.J. et al. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine manure using Whatman FTA card technology and LightCycler real-time PCR. Foodborne Pathog. Dis. 2006; 3: 212–215.
25. Pavlik I., Horyathova A., Bartosova L., Babak V., Moravkova M. IS900 RELP types of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces and environmental samples on four dairy cattle farms. Veter. Med. 2010; 55(1): 1–9.
26. Pinedo P.J., Rael D.O., Williams J.E. et. al. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for detection of paratuberculosis in dairy cows. Transbound. Emerg. Dis. 2008; 55: 125–133.
27. Stanley E.C., Mole R.J., Smith R.J. et al. Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria with 48 hours. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 1851–1857.
28. Szteyn I., Wiszniewska-Laszczych A., Ruszczynska A. Effectiveness of *Mycobacterium paratuberculosis* isolation from raw milk by means of direct isolation of DNA and classic culture. Pol. J. Veter. Sci. 2008; 11(1): 25–28.
29. Thorel M.F., Krichevsky M., Levy-Frebaut V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *M. avium* subsp. *nov.*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.* and *M. avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 1990; 40: 254–260.

# САЛЬМОНЕЛЛЕЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Капустин А.В., Лашевцев А.И.

**Сальмонеллез (*Salmonellosis*)** — широко распространённое инфекционное заболевание всех видов животных, птицы и человека, вызываемое бактериями рода *Salmonella* семейства *Enterobacteriaceae*. Для инфекции свойственен полиморфизм клинического проявления, септико-токсический характер течения и длительное бактерионосительство [29]. Ввиду своей широкой распространённости среди продуктивных сельскохозяйственных животных и птицы, сальмонеллёт представляет огромную проблему как для ветеринарных, так и для медицинских специалистов, что связано с передачей возбудителя человеку от больного животного или с продуктами питания. Хозяйства, сталкиваясь с проблемой сальмонеллеза, несут большие потери из-за смертности молодняка, снижения продуктивности и качества продукции, а также наложения ограничительных мероприятий.

В соответствии с классификацией микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения — род *Salmonella* относится к 4 группе биологической опасности, за исключением серотипов *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* и *Salmonella typhi*, относящихся к 3 группе.

**Этиология.** Возбудитель сальмонеллёза — бактерии рода *Salmonella*. Из множества научных публикаций известно, что наибольшей этиологической значимостью обладают *Salmonella dublin*, *S. typhimurium*, *S. berta*, *S. newport*, *S. montevideo*, *S. infantis*, *S. agona* и т.д. Тем не менее при возникновении подозрения на сальмонеллёт нельзя

исключить спорадическое выделение и иных сероваров.

Все виды сальмонелл являются грамотрицательными палочками, не образующими спор и капсул, факультативными анаэробами. Серотипы *S. typhi* и *S. paratyphi C* могут образовывать микрокапсулу [3]. Благодаря наличию жгутиков бактериальная клетка обладает способностью к движению (исключением является *S. gallinarum* и *S. pullorum*). Сальмонеллы — хемоорганотрофы (прокариоты, использующие в качестве источника энергии химические соединения, а в качестве источника углерода — органические вещества), оксидазо-отрицательны, каталазоположительны. Температурный оптимум для роста сальмонелл составляет 35–37°C, но рост возможен и при температуре 43°C [2]. Оптимальная концентрация водородных ионов — 7,0–7,2, однако изоляты сальмонелл могут расти при pH ниже 7,0 и выше 8,0 [11].

Современная классификация свидетельствует о наличии двух видов рода *Salmonella* — *enterica* (включает 6 подвидов: *subsp. enterica*; *subsp. salamae*; *subsp. arizona*; *subsp. diarizonae*; *subsp. houtenae*; *subsp. indica*) и *bongori* (зачастую рассматривается как сапрофитный патоген). В свою очередь, сальмонеллы делятся на множество сероваров, отличающихся по антигенным свойствам. Общее количество сероваров на период выхода 9 издания схемы антигенной структуры (январь 2007 года) составляет 2579 шт. Обилие серотипов сальмонелл объясняется изменчивостью генов флагеллинов, которая обусловлена генетическими рекомбинациями, горизонтальным переносом генов, точечными мутациями, дупликациями и

делениями. Все это дает сальмонеллам возможность приспособиться к иммунной системе макроорганизма.

Культуры сальмонелл хорошо растут на большинстве питательных сред — МПА, МПБ, ПЖА, агарах — Эндо, Левина, Плоскирева, XLD, SS agar и т.д. На мясо-пептонном бульоне (МПБ) через 3–4 часа роста при температуре 35–37°C сальмонеллы образуют равномерное помутнение, а через 18–24 часа — небольшой осадок на дне пробирки, легко разбивающийся при встряхивании в равномерную взвесь. Некоторые свежевыделенные из органов павших животных изолятами сальмонелл при росте в бульоне образуют легко разбивающуюся пленку [26]. На мясо-питательном агаре колонии сальмонелл прозрачные, нежные, голубоватые; на среде Эндо — розоватые, прозрачные; на среде Плоскирева — бесцветные, но выглядят более плотными и мутноватыми. На агаре с эозином-метиленовым синим культуры растут в виде прозрачных колоний, иногда с фиолетовым оттенком. На висмут-сульфитном агаре почти все сальмонеллы образуют черные колонии с характерным блеском. При этом наблюдается окрашивание среды под колонией в черный цвет. Исключение составляют *S. paratyphi A* и некоторые другие серовары, которые на этой среде образуют светлые, нежные зеленоватые колонии. Черные колонии при росте сальмонелл образуются также на сальмонеллезно-шигеллезном SS-агаре. В качестве сред накопления используют питательные среды: селенитовую, магниевую, среды Кауфмана, Мюллера, Килиана и т.д.

При выделении из клинического материала изоляты сальмонелл могут иметь различные варианты диссоциации. Причиной этого явления считают происходящие на генетическом уровне спонтанные внутригеномные рекомбинантные перестройки различных ти-

пов, которые относятся к адаптивным мутациям [7].

В современной системе идентификации представителей рода сальмонелл среди других представителей семейства *Enterobacteriaceae* используют ряд биохимических тестов, основанных на метаболических особенностях бактерий.

Биохимические свойства различных подвидов и сероваров сальмонелл приведены в табл. 1.

Антителная структура сальмонелл, на основании которой в 1940 году предложена их классификация (по Кауфману и Уайту), исследуется путем определения соматических (O) и жгутиковых (H) антигенов.

O-антител (соматический) — термоустойчивый липосахаридно-белковый комплекс, белковый компонент которого обуславливает его антигенность и колициногенность, липидные компоненты — токсичность, а полисахарид — серологическую специфичность. Высокополиморфный поверхностный полисахарид является частью липополисахарида, локализованного на внешней мембране. Соматический антиген выдерживает кипячение в течение 2,5 часов и незначительно разрушается автоклавированием при 120°C в течение 30 мин., не разрушается спиртом, денатурируется формалином. Термолабильный жгутиковый H-антител может являться монофазным или двухфазным. В одной и той же популяции определяются либо обе фазы H-антитела, либо одна из фаз. Отдельная клетка не может синтезировать обе фазы H-антитела одновременно [9, 31]. Жгутики являются внеклеточными белковыми термолабильными образованиями, которые могут быть легко отделены от клетки без нарушения ее жизнедеятельности. Жгутики разрушаются при температуре 60°C, а также при действии звуковых и ультразвуковых волн, но высокоустойчивы к воздействи-

Таблица 1. Биохимические свойства бактерий рода *Salmonella*

Тест	Сокращенное название	<i>Salmonella bongori</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>dianzone</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	<i>Salmonella</i> serovar <i>enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> serovar <i>paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> serovar <i>typhi</i>
Индол	IND	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Уреаза	URE	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Аргинин	ARG	(+)	d	d	d	d	(+)	d	(—)	—
Орнитин	ORN	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Лизин	LYS	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Сероводород	H2S	+	+	+	d	+	+	+	(—)	+
Цитрат Симмонса	SCI	(+)	+	+	d	+	+	+	—	—
Малонат	MAL	—	+	+	—	—	+	—	—	—
β-галактозидаза	ONP	(+)	+	(+)	—	—	(—)	—	—	—
Салицин	SAL	—	—	—	—	d	—	—	—	—
Сорбигил	SOR	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Мелибиоза	MLB	(+)	+	+	d	+	(—)	+	+	+
Целлобиоза	CEL	—	—	—	—	d	—	—	—	—
Лактоза	LAC	—	(—)	(+)	—	—	—	—	—	—
Трегалоза	TRE	+	+	+	—	+	+	+	+	+
Маннитол	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-глюкуронидаза	GLR	—	d	d	—	—	—	—	—	—
Дульцит	DUL	(+)	—	—	—	—	(+)	+	(+)	—
Адонитол	ADO	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Арабитол	ART	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Сахароза	SUC	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Инозитол	INO	—	—	—	—	—	—	d	—	—
Раффиноза	RAF	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Эскулин	ESL	—	—	—	—	—	(—)	—	—	—
β-ксилоксидаза	bXY	(—)	—	—	(—)	—	—	—	(—)	—

+ — положительная реакция;

d — вариабельная реакция;

(+) — большей частью положительная реакция;

— — отрицательная реакция;

(—) — большей частью отрицательная реакция.

вию формалина. Различия строения Н-антитела внутри каждой группы сальмонелл позволяют дифференцировать их на серологические варианты (серовары).

Как уже было сказано, в настоящее время насчитывается более 2579 серотипов сальмонелл, ввиду этого для

полной идентификации сальмонелл необходима их серологическая типизация по О- и Н-антителам в реакции агглютинации с поливалентными групповыми О-сыворотками и с монорецепторными О- и Н-антителами сальмонеллезными сыворотками.

Патогенность сальмонелл обусловлена способностью вырабатывать липидный и белковые токсины, прикрепляясь к поверхности эпителиальных клеток и размножаться внутри макрофагов печени и селезенки. Липидный эндотоксин предохраняет микробную клетку от фагоцитов. Потеря способности возбудителя продуцировать данный токсин ведет к снижению у него колонизирующей активности в кишечнике и селезенке [14]. Белковые токсины представлены термолабильным энтеротоксином (обеспечивающим стимуляцию секреции эпителиальных клеток, что в свою очередь приводит к накоплению жидкости в кишечнике и развитию диареи [22]) и термостабильным цитотоксином (вызывающим структурные повреждения эпителиальных клеток кишечника [21, 25]). Способность сальмонелл прикрепляться к поверхности эпителиальных клеток обусловлена наличием фимбрий, а также продукцией маннозорезистентного гемагглютинина [17, 24]. В инвазии сальмонелл в эпителиальную клетку участвуют фимбрии типа 1 и различные бактериальные протеины, синтез которых индуцируется при контакте бактериальной и эпителиальной клеток [16, 30]. При гибели сальмонелл высвобождается эндотоксин, который угнетает деятельность ЦНС, а также может вызывать миокардит, миокардиодистрофию и инфекционно-токсический шок. Бактериемия приводит к инфицированию различных органов (желчного пузыря, почек, печени, костного мозга, твёрдых мозговых оболочек и др.) и вторичной инвазии эпителия кишечника (особенно пейеровых бляшек).

Сальмонеллам свойственна способность длительно сохраняться и размножаться при благоприятных условиях во внешней среде. Так, в воде открытых пресных водоемов микроорганизмы рода *Salmonella* выживают до 120 дней,

в морской воде — до 30 дней, в сточных водах — несколько месяцев [20]. Также сальмонелла живет и размножается в течение длительного времени в пищевых продуктах, в частности в сыром мясе и колбасе до 4 месяцев и более, в солёном мясе до 6 месяцев, в замороженном сохраняет жизнеспособность 2–3 года; в молоке и молочных продуктах, сливочном масле — от 1,5 до 6 месяцев; в яичном порошке, яйцах, сыре — от 3 до 9 месяцев. Сохранность сальмонелл в помете и фекалиях составляет месяцы и годы [8]. При температуре от 0 до  $-2^{\circ}\text{C}$  сальмонеллы могут выживать в течение 5–6 месяцев, а при  $+60\dots+80^{\circ}\text{C}$  сохраняют жизнеспособность до 40 минут. При биотермическом обезвреживании навоза сальмонеллы инактивируются в течение трёх недель. Патоген обладает повышенной устойчивостью к воздействию поваренной соли, которая угнетает развитие многих микроорганизмов. В кислой среде жизнеспособность сальмонелл значительно снижается, а при длительной экспозиции они погибают.

Полного стерилизующего эффекта при сальмонеллезе достигают применением дезинфицирующих веществ. Так, 5% раствор ксилонафта при температуре  $18\dots20^{\circ}\text{C}$  полностью обезвреживает поверхности. Подогретый до 60 градусов 3% раствор гидроксида натрия обезвреживает поверхности за 2 часа, а раствор хлорной извести — за 1 час.

**Эпизоотология.** В связи с широкой распространённостью сальмонеллёза по всему миру этиологически важные сероварианты возбудителя, являющиеся причиной данного заболевания у молодняка КРС, имеют неравномерное распространение. Например, по данным зарубежной литературы, в Великобритании сальмонеллёз крупного рогатого скота наиболее часто вызван сероваром *S. dublin* — в 72,5% случаев. Вторым и третьим по частоте встречаемости се-

роваром является *S. mbandaka* — 7,5% и *S. typhimurium* — 5% случаев. В Новой Зеландии в 1983–1999 гг. наибольший урон скотоводству приносили *S. typhimurium* и *S. bovismorbificans* [13], и в единичных случаях от телят выделяли другие сероварианты: *S. brandenburg*, *S. enteritidis*, *S. saintpaul*, *S. senftenburg*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. havana*, *S. hindmarsh* с летальными исходами [32].

Истинная структура и распространённость сальмонеллёза крупного рогатого скота в ЕС неизвестна, несмотря на множество систематических мониторингов, но основными сероварами сальмонелл у КРС являются *S. dublin* и *S. typhimurium*. В РФ наиболее важное этиологическое значение в развитии сальмонеллеза крупного рогатого скота также играет серовар *Salmonella dublin*, реже *Salmonella enteritidis*.

Сальмонеллёзу наиболее подвержены телята в возрасте от 10 до 60 дней. Болезнь не является строго сезонной, но наибольшее количество заболевшего молодняка в стаде наблюдается в зимне-стойловый период, а также в пик массовых отелов на фоне авитаминозов и плохого кормления. В первую очередь болезнь проявляется у ослабленных телят. Взрослые и откормочные животные переболеваю в скрытой форме, после чего остаются бактериососителями. Данные животные выглядят клинически здоровыми, но при возникновении любого стресс-фактора скрытая форма переходит в острую. Для молочного скотоводства сальмонеллоносительство является огромной проблемой, поскольку повышается риск контаминации производимой продукции, а также может приводить к abortам.

Источником инфекции служат больные и переболевшие животные. Выделение происходит с мочой, калом, молоком, носовыми истечениями, слюной, в случае abortов — последом и abortированным плодом. Молодняк заражается

алиментарным путем при употреблении воды и корма, так как по своей природе данная инфекция относится к фекально-оральным [1, 10, 15]. Помимо алиментарного пути передачи возбудителя известен аэрогенный путь [18, 33].

**Патогенез.** Попав в пищеварительную систему теленка, бактерии быстро размножаются в кишечнике, вырабатывая эндотоксины, высокая концентрация которых вызывает воспаление слизистой. Токсические вещества играют существенную роль в патогенезе заболевания: вызывают геморрагическое воспаление кишечника и приводят к нарушению микроциркуляции крови вплоть до развития инфекционно-токсического шока. Одновременно развивается ДВС-синдром (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови), который является следствием воздействия эндотоксина. Также происходит снижение тонуса сосудов, нарушение терморегуляции и гемостаза.

Повышенная восприимчивость молодняка связана с возрастными особенностями обмена веществ. При ослабленной резистентности организма сальмонеллы преодолевают защитные барьеры, проникая в лимфатическую систему кишечной стенки, откуда попадают в лимфо- и кровоток и разносятся по всему организму. Рассматриваемый микроорганизм воздействует на энтероциты экзотоксинами, ферментами и другими факторами патогенности, которые проникают из кишечника в кровяное русло, вызывая паратифозную септициемию со всеми характерными признаками: токсемией, дегенеративными изменениями в паренхиматозных органах, особенно в печени и сердце. В результате действия токсинов на стенки сосудов в организме больного теленка начинаются экссудативные процессы, идет диапедез эритроцитов, что обуславливает наличие обильных геморрагий на серозных и слизистых покровах.

Попадая в кровь, токсические продукты оказывают свое действие на центральную нервную систему и другие органы, вследствие чего нарушается их деятельность, резко снижается резистентность организма, что приводит к генерализации инфекции и летальному исходу.

При аэрогенном заражении воротами инфекции служит слизистая дыхательных путей, где на месте внедрения развивается очаговое или диффузное воспаление. Генерализация болезни может произойти и без формирования первичного очага. В экспериментальных условиях инфекцию у телят можно вызвать при пероральном введении  $10^6$ – $10^{11}$  м.кл. *S. dublin* и 104–1011 м.кл. *S. typhimurium*. При определенных условиях и высокой вирулентности штамма инфекцию возможно воспроизвести в еще меньших дозах возбудителя [33].

Также патогенез болезни изучали путем экспериментального заражения стельных телок в возрасте 27–44 месяцев, что способствовалоabortам, происходившим, как правило, на 170–185-й день. После внутривенного введения штамма возбудителя из крови попадал в селезенку, печень, легкие, лимфатические узлы уже на вторые сутки, а в плаценте максимальная концентрация наблюдалась через 6–8 дней. Поражение плаценты, вызванное *S. dublin*, приводит к изменению гормонального статуса, что и провоцирует abort. Как правило, другие клинические проявления сальмонеллеза у abortировавшего животного отсутствуют.

**Клинические признаки.** Сальмонеллезом болеет преимущественно молодняк, при этом наиболее восприимчивы новорожденные телята, не получавшие молозива в течение первых 12 часов жизни [18]. Как правило, телята заболевают в возрасте 10–60 дней, но иногда болеют и старшие возрастные группы. Инкубационный период у телят составляет от 24 часов до 7 суток, что зависит

от резистентности и физиологического состояния организма, вирулентности возбудителя, условий содержания, наличия стресс-факторов и т.д.

Сальмонеллез может протекать в острой, подострой и хронической формах. Острое течение характеризуется повышением температуры, общим угнетением, вялостью, малоподвижностью. Животные с трудом передвигаются, много времени лежат, при этом шея находится в вытянутом состоянии.

Острое течение инфекции начинается лихорадкой, температура колеблется в пределах 40–41°C. Болезнь сопровождается нарушением сердечной деятельности, аритмией, пульс учащается до 110–150 ударов в минуту. При проведении аусcultации сердечный толчок разлитой, стучащий. Количество дыхательных движений учащается до 60–80 в минуту. В начале болезни у телят выявляют серозный конъюнктивит с обильным слезотечением. Отмечается снижение аппетита, обильные истечения из носа. Расстройство кишечника возникает на третий день болезни или же раньше. Фекалии приобретают жидкую консистенцию, содержат слизь и иногда примесь крови, имеют зловонный специфический запах. Профузный понос сопровождается тенезмами. При тяжелом течении сальмонеллеза у телят происходит поражение почек и развивается олигурия. Моча становится мутной, преобладает повышенная кислотность, при анализе в моче обнаруживается белок, эпителиальные клетки, гиалиновые цилиндры и эритроциты. Тяжелая форма болезни характеризуется усилением данных симптомов. При тяжелом течении болезни вышеуказанные симптомы нарастают и гибель животного происходит через 1–2 дня. При высокой резистентности организма болезнь может протекать в более легкой форме.

При подостром течении у телят наблюдают симптомы пневмонии, проявляющиеся сухим кашлем, учащенным дыханием, одышкой. Видимые слизистые оболочки анемичные. Телята больше лежат, часто изогнув шею и закинув голову за спину. На 2–3-й день болезни появляется дисфункция пищеварения в виде поноса. Фекалии приобретают жидкую консистенцию с неприятным запахом, серо-желтого цвета. Зачастую в фекальных массах можно обнаружить примеси слизи и/или крови. Дальнейшее течение характеризуется непроизвольным профузным поносом. Осложнение патологического процесса приводит к поражению мочевыводящей системы, в частности почек, что сопровождается болезненным мочеиспусканием. При отсутствии своевременного лечения наступает коматозное состояние и гибель. Нередко у больных животных, особенно при хроническом течении болезни, наблюдают опухание суставов, главным образом запястного и скакательного. При сальмонеллезе, вызванном *S. dublin* и *S. typhimurium*, у взрослых животных обнаруживают желтуху, у коров — массовые abortы.

Хроническое течение сальмонеллёза можно назвать продолжением подострого течения. Клинические признаки заболевания, проявляющиеся при остром течении, сглаживаются, улучшается пищеварение, появляется аппетит, животное проявляет активность. Температура тела держится на постоянном уровне в пределах 40,5–41,5°C. Несмотря на улучшение со стороны желудочно-кишечного тракта, наблюдаются осложнения со стороны дыхательной системы. Выделения из носа становятся слизисто-гнойными. Редкий сухой слабый кашель постепенно переходит в частый влажный. Аускультация лёгких позволяет услышать жесткое везикулярное дыхание, с патологическими

шумами — сухими хрипами. После проявления кашля постепенно появляются признаки пневмонии, сопровождающиеся повышением температуры тела, при аусcultации слышна крепитация. Так же может развиться хромота, связанная с воспалительным поражением суставов конечностей. Пораженные суставы увеличены, местная температура повышенна, болезненные при ощупывании. Отсутствие своевременного лечения усугубляет и затягивает излечение [23].

**Патологоанатомические изменения** могут быть весьма разнообразными и зависеть как от вирулентности возбудителя, так и от формы течения болезни, возраста телят. В превалирующем количестве случаев основные изменения обнаруживаются в органах пищеварения. Слизистая желудка воспаленная, набухшая, с кровоизлияниями. Содержимое кишечника жидкой консистенции, серо-жёлтого цвета и с большим количеством пузырьков газа. Слизистая оболочка кишечника набухшая, гиперемированная, с множественными точечными кровоизлияниями. В отдельных случаях слизистая оболочка толстого кишечника вследствие обильной клеточной инфильтрации утолщена, серо-белого цвета, собрана в складки, покрыта фибринозными пленками, иногда под складками заметны кровоизлияния. Лимфатические узлы брыжейки увеличены и гиперемированы. Селезенка серо-красного цвета, увеличена в размере, имеет закругленные края. Капсула напряжена, часто с кровоизлияниями.

Печень при остром течении обычно изменений не имеет. На эпи- и эндокарде, на легочной и реберной плевре кровоизлияния. В легких — острая застойная гиперемия, отек и начальные стадии развития катаральной бронхопневмонии. Чаще наблюдаются поражения передних долей легких, которые увеличены, уплотнены, серо-красного цвета.

При хроническом течении труп истощен. Передние, средние, а иногда и краиальные части легких уплотнены, бугристые, серовато-красного или вишнево-красного цвета, под плеврой серовато-желтые гнойно-некротические очажки. У отдельных телят воспаленные участки легких имеют фибринозные спайки с реберной плеврой. В суставах, особенно коленном и скакательном, серозное воспаление. Печень увеличена, дряблая, на разрезе дольчатость сглажена, неравномерно окрашена, иногда содержит желто-серые очажки некроза. Селезенка увеличена. Воспаление кишечника выражено слабо, но часто регистрируют острый катаральный гастроэнтерит и проктит, у старших телят — крупозно-дифтерическое воспаление подвздошной кишки, гиперплазию пейеровых бляшек тонкого кишечника, геморрагический диатез, септическую селезенку, зернистую и жировую дистрофию печени, почек и сердца, милиарные гранулемы и некрозы в печени, катарально-фибринозную плевропневмонию.

**Диагностика.** На основании эпизоотиологических данных, клинических признаков и патоморфологических изменений ставят предварительный диагноз. Окончательный диагноз устанавливается на основании результатов лабораторно-диагностических исследований при выделении чистой культуры возбудителя. Серологическая диагностика сальмонеллеза крупного рогатого скота не распространена ввиду отсутствия коммерческих наборов, хотя метод широко используется в птицеводстве.

Полимеразная цепная реакция используется для экспресс-диагностики заболевания. Тест-система предназначена для выявления ДНК бактерий рода *Salmonella* в крови, фекалиях, молоке, продуктах убоя животных, пищевых продуктах и кормах животного и раститель-

ного происхождения. Особенностью являются высокая чувствительность метода, позволяющего выявить 10 микробных клеток в 1 мл исследуемой пробы, специфичность составляет 100%.

Решающее значение при постановке диагноза на сальмонеллез имеет проведение лабораторных исследований бактериологическими методами: выделение возбудителя, изучение его свойств, патогенности. Выделенные культуры сальмонелл типируют поли- и монорецепторными диагностическими сыворотками. В качестве патологического материала для исследования используют паренхиматозные органы и ткани — образцы легких, печени, селезенки, кишечника, крови. В настоящее время регламент проведения лабораторно-диагностических исследований образцов, полученных от животных и птиц, на сальмонеллез отсутствует. Ввиду этого диагностика проводится согласно МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды».

**Дифференциальный диагноз.** При подозрении на сальмонеллэз проводят дифференциацию от эшерихиоза, диплококковой инфекции, пастереллеза и диспепсий неинфекционной этиологии.

**Лечение.** Лечение должно быть комплексным и включать в себя меры, направленные на подавление сальмонелл в организме больного теленка, снятие симптомов интоксикации и восстановление нарушенных функций органов пищеварения и дыхания. Перед началом лечения больных телят изолируют в отдельное помещение и переводят на диетическое кормление. Животным назначают поливалентные антитоксические сыворотки против сальмонеллеза в комплексе с антибактериальными препаратами. В настоящее время в РФ широко используют для лечения сыво-

ротку антитоксическую поливалентную против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц, а также комплексную сыворотку против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Препараты получают из крови клинически здоровых волов-производителей, гипериммунизированных различными антигенами возбудителей. Обе сыворотки содержат антитела к *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. abortusovis* и обеспечивают при введении формирование пассивного иммунитета продолжительностью до 14 дней.

Антибиотики при сальмонеллезе применяют после предварительной подтировки выделенных от больных животных изолятов сальмонелл, поскольку многочисленными исследованиями отмечено, что большинство изолятов сальмонелл полирезистентны к химиотерапевтическим препаратам различных групп [5, 6, 9]. Проблема резистентности сальмонелл актуальна с 1972 года, когда в ряде стран были зарегистрированы вспышки, вызванные штаммами *S. typhi*, устойчивыми к хлорамфениколу, сульфаниламидам, тетрациклином и стрептомицину, тогда как ампициillin и ко-трилоксазол сохраняли активность. Через 20 лет практически повсеместно обнаруживали штаммы, устойчивые и к этим antimикробным препаратам [4, 27, 28].

Многообразие механизмов резистентности сальмонелл к антибиотикам, возможность горизонтальной передачи детерминант резистентности от других видов микроорганизмов, нерациональное применение антибиотиков в клинической и сельскохозяйственной практике способствуют быстрому распространению сальмонелл, резистентных к различным препаратам. Антибиотико-резистентная сальмонеллезная инфекция возникает либо в результате инфицирования исходно устойчивы-

ми к антибиотикам штаммами, либо в результате приобретения ими резистентности в ходе антибактериальной терапии [4]. Резистентность сальмонелл обусловлена передачей им мобильных генетических элементов резистентности от бактерий нормофлоры желудочно-кишечного тракта. С другой стороны, это может быть селекция устойчивых штаммов вследствие формирования субтерапевтических концентраций антибиотиков в очаге инфекции [12].

При лечении сальмонеллезных пневмоний хороший результат получают от сочетанного применения антибиотиков и сульфаниламидных препаратов. Сульфаниламидные препараты активны главным образом в отношении кокковой микрофлоры, действие их на сальмонеллы весьма умеренное, поэтому применение сульфаниламидов оправдано при хроническом течении болезни, когда развивается пневмония. Хорошие результаты при лечении получают при использовании нитрофурановых препаратов.

При хроническом течении сальмонеллеза хорошие результаты получают от блокады звездчатого симпатического узла 0,5%-ным раствором новокаина в дозе 0,5 мл на 1 кг массы тела животного.

Для уменьшения интоксикации и улучшения сердечной деятельности внутривенно больным телятам вводят раствор глюкозы с аскорбиновой кислотой, подкожно — кофеин или камфорное масло.

**Профилактика.** Согласно санитарным правилам и нормам:

- не допускается совместное содержание животных различных видов и направлений;
- корма, обсемененные сальмонеллами, должны быть обеззаражены или уничтожены;
- во всех случаях вынужденного убоя животных мясо и органы должны быть подвергнуты бактериологическому исследованию на сальмонеллез;

— трупы павших от сальмонеллеза животных, а также abortированные плоды должны быть утилизированы.

Для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота необходимо:

— обеспечить животных полноценным кормлением, особенно в период стельности и в течение первых десяти дней после отела;

— своевременно выпаивать чистое теплое молозиво первого удоя новорожденным телятам (не позднее 1,5 часа после рождения);

— формировать группы животных в изолированных секциях только из телят одной возрастной группы.

Телята с тяжелым течением заболевания должны быть выбракованы (они являются активными бактерионосителями).

Животных вакцинируют против сальмонеллеза:

— при выявлении клинически больных особей;

— при наличииabortов сальмонеллезной этиологии;

— при выявлении сальмонеллоносительства;

— при постановке молодняка на откорм.

При установлении диагноза на сальмонеллез вводятся ограничения и проводятся соответствующие мероприятия:

— больных и подозрительных по заболеванию животных изолируют и лечат;

— клинически здоровых и выздоровевших животных вакцинируют;

— производственные помещения и выгульные площадки очищают и дезинфицируют;

— запрещают перегруппировку животных;

— запрещают вывоз для племенных целей и продажу населению до снятия ограничений.

Предприятие или его отдельное подразделение считают оздоровленным от

сальмонеллеза через 30 дней после последнего случая выделения клинически больных животных, проведения вакцинации и заключительной дезинфекции.

Для дезинфекции помещений, предметов ухода и прочего инвентаря используют хлорную известь с 25%-ным содержанием активного хлора, 20%-ную взвесь гашеной извести (для побелки), горячий 4%-ный раствор едкого натра, 2%-ный раствор формалина.

**Иммунитет и специфическая профилактика.** После переболевания у животного создается устойчивость к последующему заражению. С возрастом восприимчивость молодняка к сальмонеллезу падает. Новорожденные телята получают антитела с молозивом матери (колостральный иммунитет). Антитела молозива обеспечивают активную защиту новорожденных против возбудителя сальмонеллеза. Исходя из этого, в сельскохозяйственных предприятиях, неблагополучных по сальмонеллезу, проводится иммунизация глубокостельных коров против рассматриваемой инфекции.

Для специфической профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота на территории страны применяется две инактивированные вакцины, обеспечивающие формирование иммунитета у коров к *Salmonella dublin*, и в последующем — колострального иммунитета у телят при своевременной выпойке молозива. Длительность колострального иммунитета составляет 15–18 суток, после чего телят вакцинируют двукратно. Невосприимчивость к заражению формируется через 12–15 суток и сохраняется до 6 месяцев.

## Литература

1. Ахмедов А.М. Сальмонеллезы (патологии) молодняка. М.: Колос, 1983; 256.

2. Загаевский И.С. Сальмонеллезы животных. Киев: Урожай, 1977; 143.
3. Зайнуллин Л.И. Электрофосфоретические и антигенные свойства полипептидов сальмонелл и идентификация их геномов ПЦР: дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2003; 157.
4. Иванов А.С. Антибиотикорезистентность и антибактериальная терапия сальмонеллезов. Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. 2009; 11(4): 305–326.
5. Красильникова В.М., Верехин В.В., Воложанцев Н.В. Изучение плазмид *Salmonella enteritidis*. Сб. науч. тр. ВГНКИ. М.: ВГНКИ, 1996; 59: 69–75.
6. Куликовский А.В. Совещание ВОЗ по проблеме сальмонеллеза в животноводстве. Ветеринария. 1999; 11: 67–69.
7. Прозоров А.А. Рекомбинантные перестройки генома бактерий и адаптация к среде обитания. Микробиология. 2001; 70(5): 581–594.
8. Сидоров М.А., Скородумов Д.П., В.Б. Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. М.: Колос, 1995; 194–204.
9. Степанова Л.К. Антигенная структура сальмонелл и роль поверхностных антигенов в вирулентности и иммуногенности: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. ПМГМИ. М., 1980; 36.
10. Черкасский Б.Л. Современная эволюция сальмонеллезов. Междунар. симп. по пищевым зоонозам. М.: МГМИ, 1995; 18–19.
11. Черкасский Б.Л., Рожнова С.Ш., Тендентник Ю.А. и др. Лабораторная диагностика сальмонеллезов человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды. М.: ЦНИИ эпидемиологии Минздрава СССР, 1990; 58.
12. Aarestrup F.M., Wiuff C., Molbak K., Threlfall E.J. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2003; 47: 827–829.
13. Carter M.E., Cordes D.O., Carman M.G. Observations on acute salmonellosis in four Waikato dairy herds. *New Zealand Veterinary Journal.* 1983; 31: 10–12.
14. Craven S.E. Altered colonizing ability for the ceca of broiler chicks by lipopolysaccharide-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *Avian. Dis.* 1994; 38: 401–408.
15. Dueger E.L., House J.K., Heithoff D.M., Mahan M.J. Salmonella DNA Adenine Methylase Mutants Elicit Protective Immune Responses to Ho-294 mologous and Heterologous Serovars in Chickens. *Infect. Immun.* 2001; 69(12): 7950–7954.
16. Ernst R.K., Dombroski D.M., Merrick S.M. Anaerobiosis, type I fimbriae and growth phase are factors that affect invasion of HEp-Z cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1990; 58: 2014–2016.
17. Finlay B.B., Falkow S. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and endosome acidification is not required for bacterial invasion or intra cellular replication. *Biochimie.* 1988; 70(8): 1089–1099.
18. Gillespie J.H., Timoney J.F. Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 7<sup>th</sup> ed. Cornell University Press. Ithaca. New York. USA. 1981; 85–93.
19. Helmuth R., Stephan R., Bunge C., Hoog B., Steinbeck A., Bnlling E. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect. Immun.* 1985; 48(1): 75–182.
20. Jean S.-S., Wng P.-R., Hsueh J.-Y. Bacteremia caused by *Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis* in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2006; 39: 358–365.
21. Koo F.C., Peterson J.W., Houston C.W., Molina N.C. Pathogenesis of experimental salmonellosis inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect. Immun.* 1984; 43(1): 93–101.

22. Kovpal L.P., Diebel R.H. Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.* 1975; 11(1): 14–22.
23. Lax A.J., Barrow P.A., Jones P.W., Wallis T.S. Current perspectives in salmonellosis. *Br. Vet. J.* 1995; 151: 351–377.
24. Leung K.Y., Pinlay B.B. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88(24): 11470–11474.
25. McDonough P.L., Timoney J.F., Jacobson R.H., Khakhria R.J. Clonal groups of *Salmonella typhimurium* in New York State. *Clin. Microbiol.* 1989; 27(4): 622–627.
26. Noel R.K., John G.H., Bergeys. Manual of systematic bacteriology. 1984; 7–713.
27. Parry C.M., Hien T.T., Dugan G., White N.J., Farrar J.J. Typhoid fever. *N. Eng. J. Ned.* 2002; 347: 1770–1782.
28. Pegues D.A., Ohl M.E., Miller S.I. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: Mandell, Douglas, Bennett's Principles and practice of diseases. Ed. 6. Philadelphia. Elsevier Chuchill Livingstone. 2005; 2636–2654.
29. Pimenov N.V., Laishevcev A.I., Kolesnikova Y.N. Prophylaxis of salmonellosis of farm animals and poultry: the main directions and means. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* 2016; 12(60): 247–254.
30. Reynolds M.C., Ribeiro A.A., McGrath S.C., Cotter R.S., Raetz C.R.H., Trent M.S. An Outer Membrane Enzyme Encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR that Removes the 3' — Acyloxyacyl Moiety of Lipid A. *S. Biol. Chom.* 2006; 281: 21974–21987.
31. Smith S.M., Stocker B.A.D. Colicinogeny and recombination. *Brit. Med. Bull.* 1962; 18: 46–51.
32. Thurston J.L. Diary of an outbreak of *Salmonella* in dairy cattle. *New Zealand Vetscript.* 1999; 12(3): 6–7.
33. Wray C., Davies R.H. *Salmonella* infection in cattle. In *Salmonella in Domestic Animals*. Ed. C. Wray, A. Wray. CABI Publishing. Wallingford. UK. 2000; 169–184.

# ПАСТЕРЕЛЛЕЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Лашевцев А.И., Капустин А.В.

**Пастереллэз (*Pasteurellosis*)** — контагиозная болезнь большинства видов животных и птиц, вызываемая бактериями рода *Pasteurella*. Инфекция широко распространена во всем мире. При остром течении патологии наблюдаются септические процессы, крупное воспаление лёгких, плевриты и отёки различной локализации. Подострое и хроническое течение болезни характеризуется гноенно-некротизирующими пневмониями, поражениями суставов, молочных желез, органов зрения и геморрагическим энтеритом [6].

Типичным представителем рода является вид *Pasteurella multocida*, имеющий обширную зону распространения и высокую эпизоотическую значимость. Согласно «Руководству по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных» МЭБ, существует три отдельных нозологических единицы, вызываемых возбудителем вида *Pasteurella multocida*: геморрагическая септицемия крупного рогатого скота, атрофический ринит свиней и холера птиц. Остальные виды рода *Pasteurella spp.* имеют меньшую эпизоотическую значимость [16].

Экономический ущерб от пастереллеза складывается из падежа животных всех возрастных групп, вынужденного убоя, снижении продуктивности, затрат на проведение лечебных и профилактических мероприятий.

Согласно действующим на территории Российской Федерации методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллэза животных и птиц № 22-7/82 от 20.08.1992 г., возбудителями инфекции являются *Pasteurella multocida* и *Pasteurella haemolytica*. Но при этом стоит отметить, что вид

*Pasteurella haemolytica* в настоящее время реклассифицирован в отдельный род семейства Pasteurellaceae и назван *Mannheimia spp.* В свою очередь, ввиду биологических особенностей возбудителя, механизма развития патологического процесса, характера проявления клинических признаков, а также отсутствия возможности формирования перекрестного иммунитета *P. multocida* — *M. haemolytica* возникла необходимость отделения заболеваний, вызванных бактериями рода *Mannheimia*, в отдельную нозологическую единицу — «Манхеймиоз», подробно рассмотренный в соответствующей главе настоящего руководства [10, 17].

**Этиология.** Возбудителем пастереллэза рогатого скота (геморрагической септицемии) является бактерия вида *Pasteurella multocida* типов В и Е, при этом тип Е на территории России не встречается, но его циркуляция подтверждена в ряде зарубежных стран. Вид подразделяется на три подвида: *P. multocida subspecies gallicida*, *P. multocida subspecies multocida*, *P. multocidasubspeciesseptica*. В соответствии с классификацией микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения вид *Pasteurella multocida* относится к 3-й группе биологической опасности [5].

Все виды бактерий рода *Pasteurella* представляют собой сферические, овальные или палочковидные клетки размером  $0,3\text{--}1,0 \times 1,0\text{--}2,0$  мкм. При микроскопировании мазков-отпечатков тканей животных, а также первичных культур, выделенных из патологического материала, пастереллы обычно имеют bipolarное окрашивание, рас-

положены одинично, парно или в виде коротких цепочек. При последующих пересевах биполярная окраска у культур часто утрачивается, и пастереллы выглядят как мелкие коккоподобные палочки, имеющие капсулу. На МПА возможно образование трёх форм колоний: гладких (S), шероховатых (R) и мукoidных (M) [2].

Окрашивание культур методом Грама, Романовского–Гимза или Михина позволяет выявить полиморфные крупные биполярные коккоподобные палочки с капсулой. В случае использования метода окрашивания Бурри–Гинса возможно обнаружить крупную непрокрашенную капсулу бактериальных клеток. При использовании метода окрашивания по Граму в поле зрения микроскопа обнаруживаются мелкие грамотрицательные кокки и/или коккобациллы (рис. 1).

Все виды *Pasteurella spp.* хорошо растут на обычных питательных средах (МПБ, МПА, бульон Хоттингера, агар Хоттингера, колумбийский агар), а также на неселективных высокопитательных средах (сердечно–мозговой агар, триптон–соевый агар, триптон–соевый бульон, эугоник бульон, эугоник агар). Оптимальная температура роста — 37–38°C.

При росте на жидких питательных средах (МПБ, бульон Хоттингера) *Pasteurella spp.* вызывает равномерное помутнение с образованием слизисто-

го осадка, который при встряхивании со дна пробирки поднимается в виде косички. Культуры в M-форме растут более интенсивно и дают более выраженный слизистый осадок; R-формы образуют хлопьевидный или зернистый осадок. На агаризованных средах через 18–24 часа культивирования микроорганизм образует мелкие, круглые, выпуклые, полупрозрачные с гладкой поверхностью и ровными краями колонии в S-форме, флюоресцирующие в косо проходящем свете; колонии M-формы — более крупные слизистые колонии с непрозрачным центром; колонии R-формы — шероховатые непрозрачные. Для определения подвижности используют полужидкий МПА, в который культуры засевают уколом с последующим термостатированием в течение 18–24 часов при температуре 37–38°C. Культуры всех видов пастерелл неподвижны, рост в ПЖА отмечается по уколу без помутнения окружающей питательной среды [7].

Добавление к агаризованным средам 5–10% дефибринированной крови животных способствует улучшению роста, при этом колонии возбудителя достигают размеров 1–3 мм, имеют сероватый цвет и слизистую консистенцию. Форма колоний может существенно варьировать от четких округлых и выпуклых до больших слившихся колоний с плавными размытыми краями.



Рис. 1. Клетки *Pasteurella multocida* при окрашивании методом Грама

Дифференциацию видов проводят по ферментативным свойствам с использованием сред Гисса, бульона с феноловым красным, бульона с бромкрезоловым пурпурным. В качестве плотной питательной среды для изучения ферментативных свойств микроорганизмов могут быть использованы агар с феноловым

красным, агар с бромкрезоловым пурпурным. Для изучения биохимических свойств с целью идентификации изолята бактерий до вида используют чистую суточную культуру микроорганизма, полученную из одной колонии [20]. В табл. 1 приведены биохимические свойства видов бактерий рода *Pasteurella*.

Таблица 1. Биохимические свойства бактерий рода *Pasteurella* [1]

продолжение таблицы

Показатель	<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Pasteurella bettyae</i>	<i>Pasteurella caballi</i>	<i>Pasteurella canis</i>	<i>Pasteurella magna</i>	<i>Pasteurella langaaensis</i>	<i>Pasteurella lymphangiitis</i>	<i>Pasteurella mairii</i>	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Gallinacea</i>	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Sepctica</i>	<i>Pasteurella oralis</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Pasteurella skyensis</i>	<i>Pasteurella stomatis</i>	<i>Pasteurella testudinis</i>
Мелицитозы	—	n	n	n	n	n	—	(—)	(—)	(—)	—	—	n	n	n	
Мелибиозы	d	—	n	—	—	—	+	—	—	—	(—)	—	d	—	—	+
Рафинозы	d	—	+ <sup>1</sup>	—	+ <sup>2</sup>	—	—	—	—	—	—	—	d	—	—	d
L-рамнозы	d	d	(—)	—	—	n	—	(—)	(—)	(—)	—	(—)	—	—	—	+
Салицина	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(—)	—	—	(—)	—
D-сорбита	(—)	—	(—)	—	—	d	d	+	+	—	—	—	—	—	—	d
L-сорбозы	—	n	n	—	—	n	—	(—)	(—)	(—)	—	—	n	—	n	—
Сахарозы (сукрозы)	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
Трагалозы	—	—	—	d	d	—	+	+	—	d	+	+	(+)	+	+	d
D-ксилозы	+	—	d	(—)	—	—	—	d	+	+	+	d	—	—	—	+
Гидролиз эскулина	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	n	—	n	—
Рост на агаре Мак-Конки	+	d	—	—	—	+	d	d	d	d	d	+	d	n	—	d
Образование газа из D-глюкозы	(+)	d <sup>3</sup>	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	n	—	—

+ — положительное значение теста;

— — отрицательное значение теста;

(+) — в большей степени положительное значение теста;

(-) — в большей степени отрицательное значение теста;

d — вариабельный результат значения теста;

+1 — замедленное получение положительного значения теста;

+2 — слабое проявление положительного значения теста;

d<sup>3</sup> — слабое проявление вариабельного значения теста;

n — не определялись

Для идентификации выделенных изолятов микроорганизмов, помимо рутинных методов, допускается использование коммерческих диагностических наборов, а также метода время пролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF). Данный метод позволяет в кратчайший период с высокой достоверностью установить видовую принадлежность бактериального агента.

Определение типа возбудителя пастереллеза позволяет выявить особенности эпизоотической вспышки и правильно разработать систему противоэпизоотических мероприятий. В Российской

Федерации наиболее распространены три типа пастерелл: А, В и D.

Тип А чаще всего вызывает пастерелллёзную инфекцию птиц, кроликов и пушных зверей, а также способствует развитию подострого или хронического течения энзоотической пневмонии у телят и поросят; тип В вызывает геморрагическую септицемию крупного рогатого скота и диких жвачных животных; тип D — пастереллёз свиней.

Типы *P. multocida* E и F на территории РФ не распространены, при этом являются возбудителями геморрагической септицемии крупного рогатого скота и

диких жвачных животных в ряде зарубежных стран.

Классификация антигенной структуры *P. multocida* за длительный период развития микробиологии неоднократно менялась. В настоящее время используются несколько систем антигенной дифференциации пастерелл:

- система Картера подразделяет *P. multocida* на пять биотипов (A, B, D, E, F) в зависимости от строения капсулного антигена, а также культуральных, биохимических и биологических свойств. Тип С был исключен автором как идентичный типу Е;

- система Хедлестоуна основана на изучении соматического антигена и разделяет *P. multocida* на 16 типов по соматическому антигену;

- система Намиока также основана на изучении соматического антигена, но при этом разделяет *P. multocida* на 11 типов.

Необходимость в структурировании подходов классификации *P. multocida* привело к объединению систем Картера с системой Хедлестоуна в единую — Картера–Хедлестоуна, позволяющую определить серотип возбудителя. В объединенной системе серотипы обозначаются по принципу «капсулный антиген: соматический антиген». Так, например, при описании серотипа A:1, подразумевается определение капсулного антигена по методам Картера, а соматического антигена — по методам Хедлестоуна.

Также объединены и системы Намиока–Картера, но для избежания неоднозначности интерпретации результатов серотиповой принадлежности в системе Намиока–Картера серотип возбудителя обозначается как «соматический антиген: капсулный антиген» — 1:A и т.п.

Согласно рекомендациям МЭБ, серовариантную принадлежность *P. multocida* следует определять по капсулному антигену в РА, РНГА, РИЭФ, а по сома-

тическому — в РА, РИД в агаровом геле. Известны методы получения антисывороток на эталонные и производственные штаммы пастерелл благодаря гипериммунизации кроликов, но данные методы в настоящее время недостаточно распространены ввиду их нестандартизированности. Тем не менее проведение серотиповой идентификации пастерелл может осуществляться благодаря использованию мультиплексной полимеразной цепной реакции (Multiplex PCR) [21].

## Несерологические методы определения типа пастереллы

**1. Дифференциация серотипов *P. multocida* с помощью акрифлавиновой пробы.** Бульонную суточную культуру *P. multocida* центрифигируют при 3000 об/мин в течение 15 минут. Надсадочную жидкость сливают, бактериальные клетки ресусцидируют в той же пробирке остатками надсадочной жидкости до получения гомогенной суспензии. К полученной суспензии добавляют 0,5 см<sup>3</sup> водного свежеприготовленного раствора акрифлавина 1 : 1000 и тщательно перемешивают.

Штаммы, относящиеся к серотипу Д, в течение 10–15 мин. после добавления раствора акрифлавина образуют крупнохлопчатый, неразбивающийся при встряхивании флоккулят.

**2. Дифференциация серотипов *P. multocida* по чувствительности к гиалуронидазе.** Бульонную суточную культуру *P. multocida* бактериологической петлей высевают на чашки Петри с агаром Хоттингера. Посев проводят, не отрывая петли от поверхности агара, параллельными штрихами на расстоянии 7–10 мм один от другого. Затем перпендикулярно посеву культуры пастерелл бактериологической петлей одним штрихом по диаметру чашки вы-

севают суточную бульонную культуру *Staphylococcus aureus*.

Чашки с посевами инкубируют при 37°C, результаты теста учитывают через 18–24 ч. Штаммы, образующие вблизи (до 5 мм) от линии роста стафилококка более мелкие колонии, чем на удалении от этой линии, относят к серотипу А.

Для дифференциации *P. multocida* типов В, Е и F несерологические методы в настоящее время не используются.

Подробная этиологическая значимость серотипов пастерелл по классификации Картера–Хедлестоуна приведена в табл. 2.

Основными факторами вирулентности пастерелл являются капсульный белок; липополисахариды; фимбрии; факторы адгезии (ptfA, fi mA, hsf-1, hsf-2, pfhA и tadD); железо-регулирующие белки (exbB, exbD, tonB, hgbA, hgbB, tbpA и Fur); внеклеточные ферменты, такие как нейрамедиаза (nanB и nanH) и гиалуронидаза (pmHAS); супeroxиддисмутаза (sodA и sodC); дермонекротоксин (toxA); а также множество различных белков внешней мембранны (ompA, ompH, oma87 и plpB), играющие роль защитных факторов. Все данные факторы ви-

рулентности регулируются 22 генами, ассоциированными с вирулентностью патогена, при этом набор генов вирулентности зависит от капсулного типа (А, В, D, E, F). Например, филламенный ген гемагглютинина pfhA преимущественно встречается у пастерелл типа А, В, Е и F. Ген получения железа tbpA ассоциируется с капсулным типом пастерелл А и В. Ген toxA, отвечающий за наличие дермотоксина, характерен для капсулного типа D [4].

Адгезины пастерелл являются фактом, обеспечивающим прочную связь патогена с эпителиальной поверхностью респираторных путей, в последующем обеспечивают устойчивость прикрепившихся клеток к физическим воздействиям со стороны макроорганизма в виде кашля и выделяемой мокроты, направленным на механическое удаление возбудителя. С целью сохранения своей позиции на слизистых оболочках, для разрушения мокроты пастереллы производят нейрамедиазу, которая приводит к деградации слизистых выделений эпителия [11].

Белки внешней мембранны играют сопутствующую роль в процессе размно-

Таблица 2. Наиболее этиологически значимые серотипы *Pasteurella multocida*

Капсулный тип	Соматический тип	Серотип	Заболевание
A	1,3,4	A:1	холера птиц
		A:3	холера птиц, лёгочный пастереллэз свиней, пастереллэз кроликов
		A:4	пастереллэз индеек
	5,6	A:5, A:6	холера птиц
	12	A:12	пастереллэз кроликов, лёгочный пастереллэз свиней
	16	A:16	холера птиц (индюшек)
B	2, 6	B:2, B:6	геморрагическая септицемия крс и свиней
D	1, 3, 4, 11	D:1, D:3, D:4, D:11	атрофический ринит свиней, пастереллэз кроликов
	7, 12	D:7, D:12	ринит, конъюнктивит, отит кроликов
E	2	E:2	геморрагическая септицемия крупного рогатого скота
F	3	F:3	холера птиц

жения бактерий, так как направлены на обеспечение сохранности жизнеспособности микроорганизмов в условиях с минимальным содержанием железа в организме больного животного, необходимого бактериям [15].

Липополисахариды, находящиеся в мембране бактериальной клетки, обеспечивают высокую степень адаптации к окружающим факторам. При этом отмечаются различия в механизмах провоцирования патологического процесса. Так, выявлена способность к стимуляции лейкоцитов с целью продуцирования противовоспалительных цитокинов, активации комплемента свертывания крови и цитолиза клеток. ЛПС обладают способностью провоцирования легочных повреждений непосредственно токсическим воздействием на легочный эндотелий и воздействием на нейтрофилы. Токсические свойства ЛПС могут быть усилены за счет образования комплекса с фосфолипидами, которые способствуют не только легочной колонизации, но и подавлению защитного действия иммунных клеток, тем самым позволяя возбудителю на этапе внедрения в организм сохраняться на поверхности тканей и инициировать дальнейшие воспалительные процессы [12].

Описываемые бактерии имеют два механизма приобретения железа. Первый из них включает в себя железосвязывающие белки, экспрессируемые на внешнюю мембрану бактериальной клетки, которые в последующем вступают во взаимодействие с гельпротеинами, связывающими железо, за что отвечает ген *TbpA*. Второй механизм подразумевает включение бактериальных белков, которые связывают гемоглобин и гемоглобиновый комплекс с гликопротеином хозяина, ген *hgbB*. В обоих случаях перенос железа через наружную мембрану является активным процессом, требующим функциональ-

ную систему *TonB*, состоящую из трех белков: *ExbB*, *ExbD* и *TonB*. В данном случае белок *TonB* является преобразователем энергии при транслокации железа, а *ExbB* и *ExbD* — белками, стабилизирующими *TonB* [14].

Устойчивость пастерелл к факторам окружающей среды низкая. В трупах павших животных возбудитель сохраняется на протяжении 4 месяцев. В дождевых и паводковых водах, в заболоченных мелких водоемах возбудитель способен сохраняться в течение 6 месяцев. При воздействии температуры 70–90°C микроорганизм гибнет в течение 10 минут.

**Эпизоотология.** Пастереллезу подвержены все виды домашних, диких, лабораторных животных и птиц. Наименьшую восприимчивость к пастереллезу имеют плотоядные животные и лошади. У птиц и кроликов заболевание имеет характер эпизоотии, в то время как у других видов животных массовые падежи обычно отсутствуют и часто характеризуются наличием первичного инфекционного процесса. Источником возбудителя являются больные и переболевшие животные-носители, не проявляющие каких-либо клинических признаков. Длительность бактерионосительства достигает нескольких лет, в связи с чем такие животные доживают до репродуктивного возраста и в случае использования их в качестве родительского поголовья могут распространять заболевание. Для пастереллеза свойственно формирование стационарного эпизоотического очага [18].

Пастереллез может развиваться как самостоятельное заболевание, но при этом наличие вирусных заболеваний или иных бактериальных патологий, проходящих в сочетанном виде, отягощают течение инфекции [13].

**Патогенез.** Развитие патогенеза инфекции подразумевает проникновение

возбудителя в организм восприимчивого животного респираторным или алиментарным путем. В первую очередь слабовирулентные изоляты колонизируют миндалины, которые являются основной локализацией патогена, маскируясь от воспалительных клеток, а также действуют как дополнительный барьер для внешних факторов. В таком виде микроорганизм может длительное время сохраняться в организме животных, не приводя к развитию видимых признаков патологии, но при этом само животное длительное время будет бактерионосителем. Вирулентные культуры после колонизации верхних дыхательных путей могут сразу проникать в кровь и лимфу, вызывая септициемию и приводя к гибели животных в течение 12–36 часов после заражения. Генерализации патологии способствуют подавление *P. multocida* фагоцитоза и образование токсинов ЛПС, что в свою очередь ведет к обширному повреждению капилляров. Факторы вирулентности, способствующие развитию пневмонии, полноценно не изучены, несмотря на то что есть определенная градация пастерелл на токсигенные и не токсигенные, именно поэтому для постановки окончательного диагноза «пастереллез» необходимо проводить биопробу с использованием лабораторной модели. Таким образом развиваются обширные отеки в подкожной и межмышечной клетчатке, а также множественные кровоизлияния различной локализации. Скорость развития септициемии зависит от вирулентности возбудителя и набора факторов вирулентности, которыми он обладает [3].

Патогенез пастереллеза может происходить быстрее за счет сочетанного течения инфекции с вирусными или иными бактериальными заболеваниями. В частности, пастереллез очень часто протекает совместно или на фоне инфекционного ринотрахеита, параг-

риппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи, манхеймииоза, клостридиозов.

В случае, если изолят *P. multocida* оказался слабовирулентным, то он, как было сказано ранее, проникает в миндалины, где длительное время может сохраняться до возникновения предрасполагающих триггерных факторов (первичные вирусные инфекции, стресс-факторы и т.д.). Такие изоляты, как правило, не вызывают быстрой гибели животных, так как не провоцируют развитие септициемии, а сама инфекция проходит в подостром или хроническом течении, развивая крупозное или катарально-гнойное воспаление легких. При сверхостром и остром течении крупозная пневмония не успевает развиваться и в легких находят лишь явления отека и гиперемии [19].

**Клинические признаки.** Пастереллэз крупного рогатого скота имеет 4 типа течения: сверхострое, острое, подострое и хроническое. К формам пастереллэза относятся септическая, отёчная, грудная и кишечная.

Сверхострое течение характерно для септической формы заболевания, при этом наблюдается резкое повышение температуры тела до 42°C, нарушения сердечной деятельности, отёк лёгких и острый гастроэнтерит. Гибель при сверхостром течении наступает в течение нескольких часов.

Острое течение может проявляться в виде грудной, отёчной и кишечной форм. Температура тела поднимается до 40°C, больные животные отказываются от корма, появляется вялость, учащенное сердцебиение. У молочных коров нарушается или прекращается молокоотдача. Со стороны пищеварительной системы наблюдается снижение моторики рубца, перистальтики кишечника, количества актов дефекации. Фекалии приобретают водя-

нистую консистенцию с возможными примесями фибрина и/или крови. Без своевременных лечебных мероприятий гибель животного наступает спустя 24–48 часов.

Отёчная форма болезни наступает при длительном развитии заболевания и характеризуется лихорадкой и развитием отёков различных тканей организма, в частности подкожной клетчатки, слизистых оболочек ротовой полости, глотки, шеи, области подгрудка, половых органов, конечностей и т.д. При поражении ротовой полости язык и слизистая оболочка имеют синюшное окрашивание. Нарушения со стороны дыхательной системы выражены в виде затруднённого хрипящего дыхания. Гибель животного зачастую наступает от асфиксии или сердечной недостаточности.

Сверхострое и острое течение пастереллёза наблюдается в основном у молодняка крупного рогатого скота.

При развитии фибринозной пневмонии или плевропневмонии заболевание приобретает грудную форму, при которой дыхание становится учащенным и затрудненным, появляется сухой кашель. Из носовых отверстий больного животного выделяются пенистые выделения, в последующем становящиеся слизисто-гнойными. Особенностью данной формы является частое поражение органов зрения в виде конъюнктивитов. Перкуссионное обследование области лёгких позволяет обнаружить участки притупления. При аускультации лёгких обнаруживается усиленное бронхиальное дыхание и шумы трения плевры при плевропневмонии. В последующем к вышеперечисленным признакам заболевания при грудной форме добавляются нарушения со стороны пищеварительной системы в виде поноса, содержащего сгустки крови.

606

Хроническое течение пастереллёзной инфекции у крупного рогатого скота характеризуется медленным развитием пневмонии, диареей, истощением организма, поражением суставов. При этом заболевание может длиться несколько недель, на протяжении которых животное является источником распространения возбудителя. Исход заболевания, как правило, летальный.

**Патологоанатомические изменения.** Для всех видов сельскохозяйственных животных, пушных зверей и птицы при сверхостром течении пастереллёзной инфекции патологоанатомические изменения не всегда развиты ввиду быстрой гибели животного.

Для острого течения пастереллеза наиболее характерным является наличие многочисленных кровоизлияний, наибольшее количество которых можно обнаружить на серозных и слизистых оболочках паренхиматозных органов и грудной полости (рис. 2).



Рис. 2. Кровоизлияния на плевре, вызванные *Pasteurella multocida*

Слизистые оболочки носовой полости имеют нехарактерные сильно кровенаполненные сосуды. В подкожной клетчатке и межмышечных тканях в области глотки, межчелюстного пространства, шеи и подгрудка обнаруживаются воспалительные отёки совместно со студенистой инфильтрацией. Лёгкие отёчны зачастую с явлениями застойного полнокровия. Трахея и бронхи содержат пенистую жидкость, надгортанник, трахея и плевра гиперемированы с точечными кровоизлияниями. Точечные кровоизлияния обнаруживаются в сердце (рис. 3).



Рис. 3. Кровоизлияния на сердце, вызванные *Pasteurella multocida*

В лимфатических узлах головы, шеи и грудной полости отмечаются признаки серозного, геморрагического или серозно-гнойного воспаления, характеризующегося уменьшением количества лимфоцитов.

Селезенка чаще всего не имеет изменений в объёме, но имеет дряблую консистенцию. Признаки зернистой дистрофии можно обнаружить в печени, почках и миокарде. Паренхиматозная ткань печени содержит кровоизлияния и некротические очаги, которые можно обнаружить непосредственно под капсулой печени. Кроме печени, некротические очаги и кровоизлияния обнаруживаются в тканях лёгких, селезенки и почках. Весьма характерным для пастереллёза является геморрагический диатез.

В пищеварительной системе наблюдаются поражения сычуга и тонкого кишечника, проявляющиеся катаральным или геморрагическим воспалением, при этом стенки пораженных органов имеют утолщение, что связано с развитием отёка. При этом стенки имеют неравномерно красный цвет и усеяны точечными кровоизлияниями. Естественные полости органов содержат увеличенное количество серозных выделений с примесями фибрина.

Для грудной формы заболевания наиболее характерным патологоанатомическим изменением считается поражение диафрагмальных долей лёгких (фибринозная пневмония).

Нередко наблюдается гепатизация ввиду заполнения альвеол экссудатом. Лёгкие приобретают мраморный вид, что связано с развитием отёка междольчатых перегородок лёгких. В случае развития воспалительных процессов на плевре и перикарде ярко выраженным становится серозно-фибринозный или фибринозный плеврит и перикардит. Переполнение кровеносных капилляров приводит к отёку лёгких, ввиду чего экссудат в скором времени заполняет альвеолы. Дальнейшее развитие патологического процесса в лёгких приводит к срастанию лёгочной плевры с рёберной плеврой, а сердечной сорочки — с сердцем. Со стороны лимфатической системы поражения охватывают бронхиальные и средостенные лимфузлы. Кровоизлияния преимущественно обнаруживаются на слизистых оболочках дыхательных путей и на серозных покровах грудной полости, но при этом не исключены кровоизлияния в иных органах. Зернистая дистрофия наблюдается в большинстве паренхиматозных органов. Влияние пастерелллёзной инфекции на пищеварительную систему приводит к острому катаральному гастроэнтериту. Брюшная полость

содержит красноватую жидкость. Слизистые оболочки кишечника и желудка гиперемированы и набухшие.

Хроническое течение заболевания приводит к образованию в лёгких некротизированных инкапсулированных очагов. Для хронической формы характерными признаками считаются поражения суставов, они становятся опухшими, что в свою очередь связано с воспалительными процессами, в последующем не исключена их деформация.

В почках обнаруживается зернистая дистрофия, а также отмирание клеток эпителия мочевых канальцев. В корковом и мозговом слоях обнаруживается сильное кровенаполнение сосудов, влекущее за собой кровоизлияния.

Серозные и слизистые оболочки мочевого пузыря не имеют кровоизлияний, но гиперемированы [8].

**Диагностика.** Диагностика заболеваний складывается из анализа эпизоотической обстановки на предприятии, анализа и оценки клинико-морфологического проявления патологии. Окончательный диагноз устанавливается на основании лабораторно-диагностических исследований с выделением чистой культуры возбудителя из клинического и секционного материала, с обязательным подтверждением патогенности культур пастерелл на белых мышах.

Лабораторная диагностика проводится с целью диагностики заболевания, выявления бактерионосительства и проведения мониторинговых исследований и предусматривает возможность прижизненного и посмертного диагностирования заболевания. Порядок проведения диагностики регламентируется действующим нормативным документом «Методические указания по лабораторной диагностике пастереллезов животных и птиц» № 22-7/82 от 20.08.1992 г.

**Дифференциальный диагноз.** При подозрении на пастереллэз взрослого круп-

ного рогатого скота необходимо производить дифференциацию заболевания от манхеймиоза, сибирской язвы, пиropлазмидоза и эмкара, для молодняка КРС необходима дифференциация от манхеймиоза, стафилококковой и стрептококковой инфекций, сальмонеллёза, колибактериоза и респираторных вирусных инфекций.

**Лечение.** Для лечения больных животных рекомендуется использование гипериммунных сывороток, в сочетании с антибактериальными препаратами. Так, на территории России в настоящее время официально зарегистрировано два сывороточных препарата для лечения пастереллеза:

– сыворотка против пастереллеза крупного рогатого скота, овец и свиней, изготовленная из крови волов-продуцентов, гипериммунизированных инактивированными клетками бактерий *Pasteurella multocida* штаммов № 8683, № 1231, № 656, № 796, № Т-80, консервированная фенолом до концентрации не более 0,5%. В 1 см<sup>3</sup> сыворотки содержится не менее 66% защитных титров специфических антител к штаммам *P. multocida*. Сыворотка обеспечивает формирование пассивного иммунитета у сельскохозяйственных животных к возбудителю пастереллеза через 12–24 часа после однократного применения продолжительностью до 14 суток. В профилактических целях сыворотку вводят подкожно в дозах, обозначенных в инструкции. С лечебной целью сыворотку вводят внутримышечно или внутривенно в двойной дозе, обозначенной инструкцией;

– сыворотка против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, изготовленная из крови клинически здоровых волов-продуцентов, гипериммунизированных инактивированными поливалентными

антигенами, содержащими культуры штаммов бактерий *Pasteurella multocida* № 8683, № 656, № Т-80, *Mannheimia haemolytica* КМИВ-В 158, *Salmonella typhimurium* № 371, *Salmonella dublin* № 373 и *Escherichia coli* № 115/2 (O115), 320 (O78:K80), адгезивные антигены *Escherichia coli* K88, K99, 987Р, F41, ТЛ- и ТС-анатоксины клеток бактерий *Escherichia coli* O115:K88, O141:K99, O9:K103:987Р, O141:F41, а также авирулентные штаммы вирусов: парагриппа-3 № ПТК-45/86 и инфекционного ринотрахеита № ТК-А (ВИЭВ) В-2. Сыворотка концентрирована раствором фенола до концентрации не более 0,5%. Сыворотка вызывает формирование пассивного иммунитета к возбудителям пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота через 12–24 часа после однократной иммунизации, сохраняющегося до 14 суток. В профилактических целях сыворотку вводят подкожно двукратно с интервалом 7–10 дней в дозах, обозначенных в инструкции. С лечебной целью сыворотку вводят двукратно с интервалом в 1–3 дня внутримышечно или внутривенно в двойной дозе, обозначенной инструкцией.

Параллельно с использованием гипериммунных сывороток для лечения пастереллеза целесообразно использовать антибактериальные препараты, подобранные в соответствии с антибиотикограммой к эпизоотическим культурам возбудителя. Так, согласно «Инструкции о мероприятиях по профилактике и ликвидации пастереллеза сельскохозяйственных животных (с Изменением)», всем больным и имеющим с ними контакт животным вводят окситетрациклин, хлортетрациклин, тетрациклин, стрептомицин, левомицетин и т.д. в дозах, обозначенных инструкцией. Современные результаты изучения антибиотикорези-

стентности говорят, что к неомицину, ампициллину, пенициллину чувствительны 9,09% пастерелл, к стрептомицину и цефтриаксону — 18,18%, к гентамицину и цефоперазону — 36,36%, к амикацину — 54,55%, к канамицину, карбенициллину, фосфомицину, рифампицину 27,27%, к хлорамфениколу, цефалексину — 45,45%, к меропенему, цефоперазону — 36,36%, ко-тримоксазолу, доксициклину, ципрофлоксацину — 63,64%, норфлоксацину, цефотаксиму — 81,82% культур соответственно [9].

**Профилактика.** Принципы профилактики и борьбы с пастереллезом животных подробно описаны в «Инструкции о мероприятиях по профилактике и ликвидации пастереллеза сельскохозяйственных животных», утвержденной Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 10 января 1980 г.

Основные подходы для профилактики пастереллоза заключаются в следующем:

- обязательное размещение всех поступающих в хозяйство животных на карантине в течение 30 дней;
- комплектование стада должно производиться исключительно из благополучных по пастереллезу предприятий;
- должен быть исключен контакт животных личного сектора с поголовьем сельскохозяйственного предприятия;
- на с.-х. предприятиях должны быть оборудованы санитарные пропускники, а персонал должен быть обеспечен сменной одеждой и обувью;
- на пастбищах организуют проведение мелиоративных работ с целью устранения заболоченности мелких водоемов и мест скопления дождевых и паводковых вод;
- обеспечение систематического уничтожения мышевидных грызунов, являющихся возможными носителями возбудителя;

– на территории неблагополучного по пастереллезу предприятия проведение вакцинации всего восприимчивого поголовья животных;

– в предприятиях, где был подтверждён пастереллез, комплектование поголовья проводят животными, предварительно подвергнутыми вакцинации;

– ввод невакцинированных животных в ранее неблагополучные стада не разрешается в течение года после его оздоровления.

В случае лабораторного подтверждения диагноза «пастереллез» ферму, отделение, или предприятие объявляют неблагополучным и на них вводятся ограничения. В этом случае запрещается:

– ввоз и вывоз за пределы предприятия животных для племенных и пользовательских целей (за исключением вывоза клинически здоровых животных на мясокомбинат);

– ввод и ввоз на предприятие восприимчивых к пастереллезу животных;

– перегруппировка животных и проведение хирургических операций, а также вакцинация против других заболеваний;

– использование мяса и мясопродуктов вынужденно убитых животных в хозяйстве. Такая продукция направляется на мясокомбинат;

– выпас животных неблагополучных групп и их поение из открытых водоемов;

– реализация молока от больных животных в необеззараженном виде;

– вынос (вывоз) из неблагополучной фермы, отделения, предприятия инвентаря, оборудования и т.д., а также кормов.

В целях купирования очага инфекции и ликвидации заболевания проводится:

– клинический осмотр и термометрия всех животных неблагополучной группы. Больных и подозрительных по заболеванию животных изолируют в

отдельное помещение, за которым закрепляют отдельный обслуживающий персонал. Персонал, в свою очередь, обеспечивают необходимыми защитными средствами, санитарной одеждой, дезинфицирующими средствами и т.д.;

– всем больным и контактирующими с больными животными вводят лечебные гипериммунные сыворотки в лечебной дозе, антибактериальные препараты (подобранные согласно подтитровке), а также другие симптоматические средства. Телятам до 3-месячного возраста, находящимся на территории неблагополучной фермы, выпаивается молоко только от здоровых коров. Спустя 14 дней после введения гипериммунных сывороток всех животных, достигших прививочного возраста, подвергают вакцинации;

– здоровых и не контактировавших с больными животными особей подвергают клиническому осмотру с термометрией и последующей вакцинацией;

– на неблагополучных фермах и предприятиях проводят систематическую дератизацию.

Текущую дезинфекцию проводят:

– в помещениях, где содержатся животные, немедленно при появлении первых случаев заболевания и падежа животных;

– ежедневно при утренней уборке в помещении с больными и подозреваемыми животными. Дезинфекции подвергается все, с чем контактировало больное животное. При входе в помещение, где содержатся больные животные, оборудуют дезбарьеры для обработки обуви;

– в помещениях и выгульных двориках, где содержались подозреваемые в заражении животные, проводят дезинфекцию после каждого случая выделения больного животного и в последующем каждые 10 дней до снятия ограничений.

В качестве дезинфицирующих средств применяют 10–20%-ную взвесь свежегашеной извести или раствор хлорной извести, содержащей 2% активного хлора, или 2%-ный раствор едкого натра, или 3%-ный раствор горячего креолина, или 0,5%-ный раствор формальдегида.

Трупы павших от пастереллеза животных сжигают, или перерабатывают на утилизаторах, или обеззараживают в биотермических ямах. Шкуры дезинфицируют 1%-ным раствором соляной кислоты, разведенной в 20%-ном растворе поваренной соли. На 1 весовую часть шкуры используют 4 весовые части раствора. Экспозиция выдержки составляет 28 часов при температуре 17–20°C.

Дезинфекцию спецодежды проводят текучим паром при экспозиции 1,5 ч. в паровой камере, или кипячением в 2%-ном растворе кальцинированной соды в течении часа, или погружением в 1%-ный раствор хлорамина на 2 часа (при расходовании 5 л раствора на 1 кг вещей). Резиновую или кожаную обувь дезинфицируют путем погружения на 2 часа в 5%-ный раствор хлорамина или в 4%-ный раствор формальдегида.

Перед снятием ограничений проводят следующее мероприятия:

- при необходимости ремонт в помещении;
- очистку выгульных дворов, территорий ферм и т.д. от навоза и мусора, с последующей дезинфекцией и перепахиванием;
- дезинсекцию, дератизацию и заключительную дезинфекцию (с использованием ранее обозначенных средств).

Ограничения снимаются через 14 дней после поголовной вакцинации животных и последнего случая заболевания пастереллезом, а также проведения комплекса вышеобозначенных мероприятий.

**Иммунитет и специфическая профилактика.** Одним из наиболее надежных способов ликвидации пастереллеза является специфическая профилактика.

В настоящее время для профилактики пастереллеза крупного рогатого скота в Российской Федерации используют «Вакцину инактивированную комбинированную против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота «КОМБОВАК-Р». Препарат изготовлен из 4 производственных штаммов вирусов: инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота, а также культур *Pasteurella multocida* (серовары А, В, Д) и *Mannheimia haemolytica*, инактивированных формалином и адсорбированных на гидроокиси алюминия в качестве адьюванта. Формирование иммунитета наступает через 14 дней после повторной вакцинации и сохраняется в течение 8 месяцев. Данный препарат разработан ООО «Ветбиохим» и имеет существенное преимущество перед своими конкурентами в том, что одновременно направлен на специфическую профилактику не только манхеймиоза и пастереллеза, но и целого ряда вирусных заболеваний, отягощающих совместное течение респираторных инфекций.

Также зарегистрированы и используются для профилактики пастереллеза ряд отечественных и зарубежных препаратов.

## Литература

1. Вейант Р., Масс У., Уивер Р. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных). Справочник. М.: Мир, 1999.

2. Воронин Е.С., Бессарабов Б.Ф. Инфекционные болезни животных: Учебник. 2007.
3. Джупина С.И. Особенности профилактики пастереллоза и геморрагической септицемии. Ветеринарная патология. 2016; 1(55): 5–11.
4. Джупина С.И. Различие контроля над эпизоотическими процессами пастереллоза и геморрагической септицемии. Ветеринария сегодня. 2015; 1(12): 53–58.
5. Капустин А.В. Диагностика пастереллоза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей: Методические указания. М., 2016.
6. Документы МЭБ. Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (млекопитающих, птиц и пчел).
7. Душук Р.В. Болезни, вызываемые пастереллами. Пастереллозы. Инфекционные болезни животных. М.: Агропромиздат, 1987; 188–195.
8. Жаров А.В. Патологическая анатомия животных: Учебник. 2-е изд. СПб.: Лань, 2013.
9. Лайшевцев А.И. Пастереллоз сельскохозяйственных животных: современная эпизоотическая ситуация на территории Российской Федерации. Биотика. 2016; 2(9): 41–43.
10. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Гулюкин А.М. Сравнительный анализ антибиотикочувствительности коллекционных штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных в период до 1990 г., с полевыми изолятами, выделенными в течение 2014–2016 гг. от крупного и мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2016; 63: 132–138.
11. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Пименов Н.В. Обзор современных средств специфической профилактики пастереллоза и манхеймиоза сельскохозяйственных животных. Ветеринария и кормление. 2017; 3: 64–66.
12. Bosch M., Garrido M.E., de Rozas P., Badiola I., Barbe J., Llagostera M. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin and haemoglobin binding proteins. Vet Microbiol. 2004; 99: 103–112.
13. Cox A.J., Hunt M.L., Boyce J.D., Adler B. Functional characterization of HgbB, a new haemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. Microb. Pathol. 2003; 34: 287–296.
14. Ewers C., Lubke-Becker A., Bethe A., Kiebling S., Filter M., Wieler L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet. Microbiol. 2006; 114(3–4): 304–17.
15. Ewers C., Lubke-Becker A., Wieler L.H. Pasteurella: insights into the virulence determinants of a heterogeneous bacterium. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2004; 9–10: 367–386.
16. Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS. Microbiol. Lett. 2006; 265(1): 1–10.
17. Hatfaludi T., Al-Hasani K., Boyce J.D., Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol. 2010; 144(1–2): 1–17.
18. Kapustin A.V., Laishevcev A.I. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 4(52): 3–12.
19. Katoch S., Sharma M., Patil R.D., Kumar S., Verma S. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*. Vet. Res. Commun. 2014; 38: 183–191. Doi: 10.1007/s11259-014-9601-6.
20. Laishevcev A.I. Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica*.

Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 54(6): 70–77.

21. Laishevcev A.I., Kapustin A.V., Pimenov N.V. Specific identification of

Pasteurella bacteria on the basis of biochemical properties in accordance with modern classification. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 1(61): 320–328.

# МАНХЕЙМИОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Лашевцев А.И.

**Манхеймиоз (*Mannheimiosis*)** — пастереллез-подобное инфекционное заболевание преимущественно жвачных видов животных, как правило, характеризующееся тяжелыми формами фибринозно-некротической плевропневмонии и септициемией. Манхеймиоз проявляется как оппортунистическая инфекция крупного и мелкого рогатого скота с неспецифичной клинико-морфологической картиной. Экономический ущерб от манхеймиоза складывается из падежа животных всех возрастных групп, вынужденного убоя, снижения продуктивности, затрат на проведение лечебных и профилактических мероприятий.

В соответствии с классификацией микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения вид *Mannheimia haemolytica* не относится ни к одной из 4 групп патогенности.

**Этиология.** Все представители рода *Mannheimia* обладают плеоморфностью, ввиду чего при микроскопическом исследовании встречаются различные формы и размеры бактериальных клеток. Обычно они выглядят как мелкие грамотрицательные палочки оvoidной или кокковидной формы. Под воздействием внешних факторов и среды, в которой находится возбудитель, его форма и размеры могут меняться. Так, при культивировании микроорганизма на бедных питательных средах или при более низких температурных режимах наблюдается преобладание в культуре удлинённых палочек и/или даже нитей. В тканях патологического материала, экссудате или свежих культурах бактерии этого

рода имеют наиболее типичную форму в виде коккобацилл, окрашивающихся bipolarно. *Mannheimia haemolytica* не имеет жгутиков и не обладает способностью образовывать споры.

Окрашенные по Граму культуры манхеймий морфологически схожи с *Pasteurella multocida*, т.е. имеют вид мелких грамотрицательных коккобацилл, при возможном одиночном или попарном расположении не исключается наличие в мазках коротких цепочек бактериальных клеток. Окрашивание культур методом Романовского—Гимза или Михина позволяет выявить полиморфные крупные bipolarные капсульные палочки.

Бактерии вида *M. haemolytica* растут на следующих питательных средах: МПБ, МПА, бульон Хоттингера, агар Хоттингера, триптон-соевый бульон, эугоник бульон, эугоник агар, колумбийский агар, ПЖА и т.д., некоторые изоляты растут на агаре МакКонки. Лучшее накопление бактериальной массы наблюдается при добавлении 5–10% дефибринированной крови или сыворотки крови барана.

На кровяном агаре *M. haemolytica* растёт в виде полупрозрачных колоний 0,5–2 мм в диаметре. При росте на мясопептонном агаре с кровью лошади, овцы или кролика отмечается незначительная зона б-гемолиза вокруг колонии, иногда заметная только после снятия колонии (рис. 1, 2). При использовании агара с кровью крупного рогатого скота зона б-гемолиза вокруг колонии *M. haemolytica* является весьма обширной — до 1–2 мм и может увеличиваться при комнатной температуре. Отдельные изоляты *M. haemolytica* растут на агаре МакКонки и спустя 24 часа термостатирования



Рис. 1. Рост колоний *Mannheimia haemolytica* на кровяном агаре спустя 24 ч. терmostатирования при 37°C

выглядят как мелкие прозрачные колонии. На МПА наблюдается скучный рост мелких, выпуклых, полупрозрачных колоний округлой формы. На бульонных средах *M. haemolytica* вызывают слабое равномерное помутнение среды.

Продолжительность хранения культуры в нативной форме, как в жидкой среде, так и на плотном агаре, не может продолжаться более чем 2–3 суток при температурном режиме от 2 до 8°C.

Для биохимической идентификации грамотрицательных бактерий до семейства Pasteurellaceae стоит использовать схему экспресс идентификации. Биохимические свойства всех видов бактерий рода *Mannheimia* приведены в табл. 1.



Рис. 2.  $\beta$ -гемолиз колоний *Mannheimia haemolytica* на кровяном агаре спустя 24 ч. терmostатирования при 37°C

Для идентификации выделенных изолятов микроорганизмов, помимо рутинных методов с использованием сред Гисса, допускается использование коммерческих диагностических наборов, разрешённых в РФ.

По антигенной структуре капсулярных полисахаридов, в соответствии с данными E.L. Biberstein, различают 17 серотипов *Mannheimia*, из которых к *Mannheimia haemolytica* относятся серотипы A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 и A17. Из оставшихся серотипов в настоящее время T3, T4, T10 и T15 относят к *Bibersteinia trehalosi*, ранее считавшиеся *Pasteurella trehalosi*, а серотип A11 — к *Mannheimia glucosida*. Данные о сероти-

Таблица 1. Биохимические свойства бактерий рода *Mannheimia spp.*

	<i>Mannheimia caviae</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Mannheimia glucosida</i>	<i>Mannheimia ruminalis</i>	<i>Mannheimia granulomatis</i>	<i>Mannheimia varigena</i>
Катализаза	+	+	+	+	d	+
Оксидаза	+	+	+	d	d	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+
Лизиндекарбоксилаза	—	—	—	—	—	—
Орнитиндекарбоксилаза	+	—	d	—	—	d

*продолжение таблицы*

	<i>Mannheimia caviae</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Mannheimia glucosida</i>	<i>Mannheimia ruminialis</i>	<i>Mannheimia granulomatis</i>	<i>Mannheimia variogena</i>
Аргининдекарбоксилаза	—	—	—	—	—	—
Образование H <sub>2</sub> S	—	—	—	—	—	—
Образование индола	—	—	—	—	—	—
ОНПГ	+	(+)	+	+	d	+
Уреаза	—	—	—	—	—	—
Реакция Фогеса–Прескауэра	—	—	—	—	—	—
Желатиназа	—	(—)	—	—	—	—
Образование кислоты из:						
D-адонитола	—	—	—	—	—	—
L-арабинозы	+	—	d	—	—	+
арбутина	+	—	d	—	d	—
целлобиозы	+	—	d	—	d	—
декстрона	—	+	+	d	d	d
дульцитола	+	(—)	—	—	—	—
фруктозы	+	+	+	+	+	+
D-галактозы	+	+	+	+	+	+
D-глюкозы	+	+	+	+	+	+
глицерола	+	d	+	d	+	(+)
инулина	n	—	—	—	—	—
лактозы	+	+	+	+	d	d
мальтозы	—	+	+	d	+	d
D-маннитола	+	+	+	+	+	+
D-маннозы	+	(—)	—	—	—	—
мелицитозы	n	—	—	—	—	—
мелибиозы	+	—	—	—	—	—
раффинозы	+	(+)	—	d	d	d
L-рамнозы	—	—	—	—	—	+
салицина	+	—	(+)	d	—	d
D-сорбита	d	+	+	—	+	—
L-сорбозы	n	—	—	—	—	—
сахарозы	+	+	+	+	+	+
трегалозы	n	—	—	—	—	—
D-ксилозы	+	(+)	+	—	—	+
Гидролиз эскулина	+	—	—	—	d	—
Рост на агаре МакКонки	+	d	d	d	—	—
Образование газа из D-глюкозы	n	—	—	—	—	—
В-гемолиз, эритроциты барана	—	+	+	—	—	+
α-Галактозидаза	+	—	—	—	—	—
α-Глюкозидаза	—	—	n	—	—	—

+ — положительное значение теста;

— — отрицательное значение теста;

(+) — в большей степени положительное значение теста;

(—) — в большей степени отрицательное значение теста;

d — вариабельный результат значения теста;

n — не определялись.

пировании манхемий по соматическому или какому-либо иному антигену в литературе не встречаются.

В настоящее время существует несколько серологических реакций, позволяющих серотипировать штаммы манхемий, в частности реакция непрямой гемагглютинации (ИНА-тест), предложенная E.L. Biberstein в 1960 году [1], реакция быстрой пластинчатой агглютинации — RPA-тест, предложенный H. Glynn с соавт. в 1978 году [3], реакция быстрой непрямой гемагглютинации — RIHA-тест, предложенный J. Fraser и другими в 1983 году [2].

Принцип серотипирования манхемий существенно отличается от такового у пастерелл. Так, серотип манхемий обозначается буквенными и цифровыми символами, например A1, где А обозначает принадлежность к биотипу, а цифра 1 — к типу «капсулльного антигена». Серотипы пастерелл также указываются буквенным и цифровым обозначением, например A1, где А обозначает принадлежность к типу «капсулльный антиген», а символ 1 — принадлежность к соматическому антигену. В настоящее время коммерческие наборы для серотипизации бактерий данного рода не производятся.

**Эпизоотология.** Манхеймиозу подвержены преимущественно жвачные животные, в особенности молодняк крупного рогатого скота в возрасте до 6 месяцев, а молодняк мелкого рогатого скота — в возрасте до 3 месяцев. Отмечена осенне-зимне-весенняя сезонность. Эпизоотической вспышке способствуют неполноценное кормление, гиповитаминозы, переболевание диспепсией в неонатальном возрасте, технологические стрессы, нарушение зоогигиенических норм содержания, скученность, повышенная влажность и т.д. Для манхеймиоза характерно персистирование возбудителя на восприимчивом поголовье, что

обуславливает рецидивы вспышек при снижении иммунного статуса животных. Основными путями распространения инфекции являются аэробенный и алиментарный путь (например с молоком больных маток при маститной форме у овец — «синее вымя»). Заболеваемость среди молодняка достигает 60%, летальность — 3–6% в хозяйствах, использующих превентивные антибиотикообработки.

Развитие инфекционного процесса при манхеймиозе требует наличия факторов, снижающих естественную резистентность организма к возбудителю. Первым фактором возникновения болезни стоит считать стресс, влекущий за собой увеличенную восприимчивость животного к любому инфекционному агенту, в том числе к бактериям вида *Mannheimia haemolytica*. При этом стресс-факторы могут классифицироваться на психологические и физические. В первом случае стресс вызывается страхом, лечебными манипуляциями, фиксацией животного. Физический стресс возникает на фоне недостатка воды и корма, усталости, скученности, нарушения зоогигиенических условий. Стоит понимать, что реакция на стрессовые факторы для каждого отдельного животного является сугубо индивидуальной. Значение стресс-фактора при развитии патологического процесса при манхеймиозе подтверждается множественными наблюдениями, свидетельствующими о возникновении массовых заболеваний после резкой смены погодных или зоогигиенических условий (теплая погода сменяется на холодную с повышенной влажностью, скученные транспортные перевозки животных и т.д.).

Вторым по значимости предрасполагающим к развитию манхеймиоза фактором стоит считать вирусные заболевания респираторной системы, влекущие за собой увеличение восприимчивости организма к *Mannheimia haemolytica*,

например парагрипп-3, респираторно-синцитиальный вирус, адено-вирусы, реовирусы, герпес-вирусная инфекция крупного рогатого скота. Вирусные агенты открывают ворота инфекции возбудителю манхеймиоза, повреждая клетки эпителия, а также снижая резистентность организма. Первостепенные вирусные агенты снижают фагоцитарную функцию легочных альвеолярных макрофагов, что впоследствии оказывает влияние на потерю их способности к фагоцитарной деятельности и невозможности продуцирования хемотаксических факторов для других клеток.

Третьим по значимости этиологическим компонентом манхеймиоза стоит признать микоплазмы и бактериальные агенты. Наибольшее значение среди данных возбудителей имеют *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. bovis*, *M. ovipneumoniae* и *M. dispar*. Большинство микоплазм способны провоцировать легочные поражения как самостоятельная единица, так и в комплексе с *M. haemolytica* и *P. multocida*. Из бактериальных агентов при развитии манхеймиоза высокое значение имеет *Bordetella parapertussis*.

**Патогенез.** Патогенез манхеймиоза на данный момент является достаточно спорным вопросом среди специалистов ввиду многофакторного характера заболевания, влекущего за собой несогласованность результатов, полученных экспериментальным путем. Считается, что *Mannheimia haemolytica* как самостоятельный бактериальный агент не способна вызвать инфекционную патологию без наличия предрасполагающих факторов, но при этом механизм развития болезни для всех видов восприимчивых животных имеет одинаковые черты. Так, начало патологического процесса связано с активацией резидентных микроорганизмов *Mannheimia haemolytica*, локализующихся на поверхности верхних дыхательных

путей и эпителиальных клеток легких и бронхов. Далее микроорганизмы по нисходящим путям проникают в центральные бронхи, бронхиолы и альвеолы. Ввиду того, что возбудитель вырабатывает фермент нейраминидазу, выделяемая мокрота не способна к полноценному выполнению своей защитной функции. Выделяемые микроорганизмом эндотоксины в инфицированных долях легких вызывают обширные внутрисосудистые тромбозы легочных вен, капилляров и лимфатических сосудов. Сосудистые нарушения в конечном итоге приводят к локальным ишемическим некрозам лёгочной паренхиматозной ткани с одновременным проявлением фибринозного воспаления (рис. 3). Тяжесть инфекционного процесса зависит от скорости и степени бактериальной пролиферации и количества выделенного лейкотоксина.



Рис. 3. Фибринозная пневмония у теленка, вызванная *Mannheimia haemolytica*

При воздействии предрасполагающего фактора у животного через несколько часов начинаются воспалительные процессы в легких, приводящие в итоге к обширному некрозу. Данный нюанс связан с активным действием лейкотоксина и липополисахаридов, которые способствуют снижению функциональности лейкоцитов, влияют на разрушение макрофагов и нейтрофилов. В междолько-

вых перегородках легких наблюдается тромбоз и вздутие, связанные со скоплением фибрина и лейкоцитов. Некроз распространяется через междольковые перегородки к соседним долям. Сам лейкотоксин не имеет прямого влияния на эпителиальные клетки, тем не менее он выступает в качестве катализатора патологического процесса.

Первичные вирусные или бактериальные агенты угнетают антимикробный барьер бета-дефензинов серозных и слизистых выделений дыхательных путей, тем самым способствуя активизации *M. haemolytica* и колонизации возбудителем слизистых оболочек бронхов и легких. Разрушение нейтрофилов высвобождает такие ферменты, как эластаза и кислые гидролазы, а также цитокины. Эндотоксины вызывают тромбоз легочных вен, капилляров и лимфатических сосудов, что в конечном итоге приводит к ишемическому некрозу лёгочной паренхимы и тяжёлой воспалительной реакции. Тяжесть течения заболевания в первую очередь зависит от вирулентных свойств возбудителя.

**Клинические признаки.** Развитие и проявление клинических признаков у всех видов восприимчивых животных имеют весьма схожие черты. Так, клиническое проявление манхеймиоза у крупного рогатого скота, как правило, имеет три фазы. Первая фаза подразумевает появление лихорадки с колебанием температуры тела на 1–2°C от физиологической нормы. Вторая фаза сопровождается развитием поражения органов дыхательной системы в виде фибринозного воспаления легких, бронхов и плевры. Третья фаза терминальная, при которой гибель животного наступает ввиду развития септических процессов.

Основными клиническими признаками манхеймиоза крупного рогатого скота различных возрастных групп являются снижение аппетита, резкое

снижение массы тела, малоподвижность, частое неглубокое дыхание, обильные истечения из глаз и носовых ходов, одышка, кашель, усиливающийся при физической нагрузке. При аусcultации прослушиваются усиленные везикулярные и бронхиальные влажные хрипы, постепенно переходящие в сухие. Легочные поражения характеризуются обширной инфильтрацией нейтрофилов и экссудацией фибрина в альвеолы и дыхательные пути. Бронхи имеют неповрежденную стенку, за исключением случаев некрозов и десквамации эпителиальных клеток. Отмечается возможность скопления в бронхах лейкоцитов и фибрин. Альвеолы отекшие, содержат фибрин, иногда сгустки крови. Лимфатические узлы опухшие.

У молодняка крупного рогатого скота можно наблюдать лихорадку с повышением температуры тела до 41°C, значительную потерю веса, кашель, учащенное дыхание, носовые истечения и диарею. Гибель животного наступает спустя 24–48 часов после воздействия стресс-фактора. Высокая смертность среди телят объясняется низким иммунным статусом и большей восприимчивостью к токсинам возбудителя.

Волосяной покров у телят может быть взъерошенным или неплотно прилегающим. Эластичность кожи сохранена или, в некоторых случаях, понижена. Целостность кожного покрова не нарушена. Слизистые оболочки ротовой полости и носовых ходов гиперемированы. Из носовых ходов больных животных, преимущественно молодняка, отмечали обильные слизистые, серозно-слизистые выделения. Совместно с проявлением лёгочной формы заболевания у молодняка до полуторамесячного возраста может наблюдаться кишечная форма, проявляющаяся диареей без примесей крови.

Летальность среди молодняка КРС может находиться в пределах 3–6%. Такой низкий показатель достигается чаще всего благодаря активному использованию антибактериальной терапии для купирования вспышек заболевания. При отказе от превентивных антибактериальных обработок заболеваемость молодняка крупного рогатого скота возрастает до 60%, летальность — до 30–40%.

**Патологоанатомические изменения.** При патологоанатомическом исследовании отмечают петехиальные геморрагии подкожной соединительной ткани, перикардит, геморрагическое поражение желудочков сердца. Поражения желудочно-кишечного тракта складывается из гиперемии слизистых оболочек, петехиальных или объёмных геморрагических поражениях сычуза. На выраженность патологоанатомических изменений влияет продолжительность заболевания и вирулентность возбудителя.

При вскрытии павших животных отмечается, что слизистая оболочка конъюнктивы серо-беловатого цвета, слизистые оболочки анального отверстия и влагалища серо-белые, бледные, слизистые оболочки ротовой полости и носовых ходов чаще всего гиперемированы, реже синюшные. Кожа суховатая, бледная, без жировых отложений. Шёрстный покров у молодняка преимущественно тусклый и взъерошенный, у взрослых особей — тусклый, но плотно прилегающий. Подкожная соединительная ткань может иметь петехиальные геморрагии. У молодняка отмечается бронхиальный лимфаденит. У взрослых особей фиксируют увеличение надвывимянных и бронхиальных лимфоузлов, их отёчность, гиперемию с инъекцией сосудов и петехиями, напряженность капсулы. На разрезе — сочная, влажная пульпа.

Септическая форма заболевания приводит к гепатосplenомегалии. Острая форма заболевания подразумевает се-

розный, геморрагический и/или фибринозный плеврит, возможно с выпотом экссудата (рис. 4). Поверхность легкого принимает мраморный вид ввиду одновременных некротических изменений и кровоизлияний.

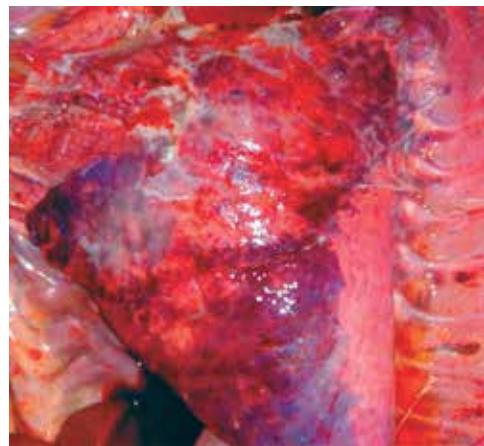


Рис. 4. Крупозная пневмония у телёнка в стадии красной и серой гепатизации и отёк лёгких; серозно-фибринозный плеврит

Легочные поражения проявляются чаще всего как долевая фибринозная бронхопневмония с явлениями фибринозного плеврита. При воспалительном процессе доминирующим явлением становится образование фибринозного экссудата в альвеолах легких, сопровождающееся интерстициальным отеком, при этом легочная ткань на срезе имеет мраморный вид (рис. 5). Поражение всегда двустороннее с краиновентральным направлением развития. Поражённые зоны становятся легко отличимыми от здоровых тканей благодаря приобретению темно-красного цвета. В пораженных областях легких развиваются множественные участки коагуляционного некроза. Средостенные и бронхиальные лимфатические узлы увеличены в размерах. В трахеях и бронхах у животных обнаруживается пенистая жидкость в больших объемах.

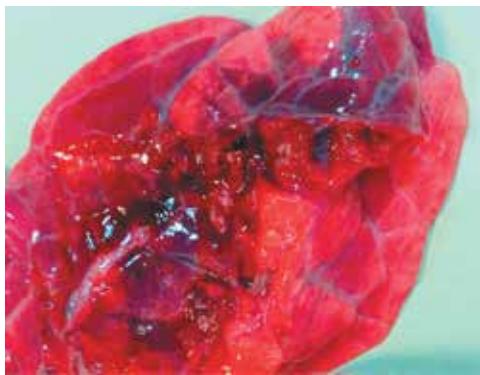


Рис. 5. Острая лобулярная катаральная бронхопневмония и отёк интерстиции (тёлёнок)

В грудной и брюшной полости может регистрироваться скопление жидкости соломенно-желтого цвета. На брюшина отмечается отложение фибрина.

**Диагностика.** Диагностика заболевания складывается из анализа эпизоотической обстановки на предприятии, анализа и оценки клинико-морфологического проявления патологии. Окончательный диагноз устанавливается на основании лабораторно-диагностических исследований с выделением чистой культуры возбудителя из клинического и секционного материала. Порядок проведения диагностики регламентируется действующим нормативным документом «Методические указания по лабораторной диагностике пастереллёзов животных и птиц» № 22-7/82 от 20.08.1992 г.

Отсутствие в указаниях серологических и молекулярно-генетических методов постановки диагноза можно объяснить тем, что в России нет официально зарегистрированных средств для данных методов. Тем не менее на зарубежном рынке можно приобрести наборы для ИФА-диагностики, в частности *Mannheimia haemolytica* ELISA KIT BioX бельгийского производства.

Среди иностранных коммерческих средств диагностики методом ПЦР существует набор для детекции *Pasteurella*

*multocida* и *Mannheimia haemolytica* методом ПЦР LSI VetMAX™ Triplex *Pasteurella multocida & Mannheimia haemolytica*.

**Дифференциальный диагноз.** При подозрении на манхеймиоз у взрослого крупного рогатого скота необходимо проводить дифференциацию заболевания от пастереллеза, сибирской язвы, эмфизематозного карбункула, пироплазмоза; для молодняка КРС необходима дифференциация от пастереллеза, стафилококковой и стрептококковой инфекций, сальмонеллёза, колибактериоза и респираторных вирусных инфекций.

**Лечение.** В соответствии с данными Европейского комитета по определению антибиотикочувствительности (Eucast), лечебная тактика при заболевании основана на предотвращении влияния первичного стресс-фактора и использования средств неспецифического этиотропного лечения — антибактериальных препаратов. Перед началом курса лечения необходимым является проведение подбора наиболее эффективных антибактериальных препаратов. В соответствии с научными данными наиболее эффективны при лечении данного заболевания антибиотики различных групп. Так, среди пенициллинов высокой терапевтической эффективностью обладает амоксикилав; среди фторхинолонов — данофлоксацин, марбофлоксацин; среди группы линкозамидов — линкомицин; среди тетрациклинов — окситетрациклин; аминогликозидов — спектиномицин; макролидов — тилмикозин, тилозин; цефалоспоринов — цефазолин, цефалексин; среди фениколов — флорфеникол. В качестве комплексных препаратов целесообразнее использовать препараты интрамицин, квинокол, кобактан, неопен, пенбекс, спектам, энроксил. В ряде зарубежных стран практикуется применение антибактериальных препаратов вновь вводимым в стадо животным как превентивная мера, позволяющая до-

стичь снижения заболеваемости и падежа [4, 5].

Плановое проведение мониторинга лекарственной резистентности любого возбудителя инфекционной патологии позволяет своевременно разработать и применить эффективную схему лечебных мероприятий. Кроме того, отслеживание тенденции появления резистентных культур микроорганизмов позволяет прогнозировать возможную потерю определёнными группами препаратов антибактериальных свойств и принимать меры по их замене либо использовании комбинированной антибактериальной терапии. При проведении исследования установлена высокая чувствительность культур *Mannheimia haemolytica* к моксифлоксации, канамицину, фосфомицину, имипенему, ко-тримоксазолу, доксициклину, норфлоксации, ципрофлоксации, энрофлоксации, цефазолину и цефалексину, поэтому использование этих препаратов позволит получать наилучший лечебный эффект [8].

Параллельно антибактериальной терапии для лечения больных животных используют гипериммунные сыворотки. Так, на территории России в настоящее время официально зарегистрирована сыворотка против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

**Профилактика.** Принципы профилактики и борьбы с манхеймиозом животных идентичны правилам борьбы с пастереллезом и подробно описаны в «Инструкции о мероприятиях по профилактике и ликвидации пастереллеза сельскохозяйственных животных», утвержденной Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 10 января 1980 г. (описание приведено в разделе «Пастереллез крупного рогатого скота» настоящего руководства).

Иммунитет и специфическая профилактика. Согласно имеющимся научным данным, при разработке средств специфической профилактики манхеймии-инфекции возможно использование различных компонентов бактериальной клетки возбудителя. Так, при изучении эффективности применения биопрепаратов против манхеймиоза, выполненных в виде бактерин-анатоксина вакцины, вакцины, выполненной из лейкотоксина, живой вакцины и вакцины, выполненной из экстракта белков внешней мембранны, доказали, что наилучший иммунный ответ достигается при использовании бактерин-анатоксина [7]. А. Mehmet с соавт. подчёркивает возможность формирования стойкого иммунитета у животных при использовании цельноклеточного антигена *Mannheimia haemolytica* [6].

В настоящее время для профилактики заболеваний крупного и мелкого рогатого скота, вызванных *Mannheimia haemolytica*, на территории Российской Федерации используют «Вакцину инактивированную комбинированную против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота «КОМБОВАК-Р». Препарат изготовлен из 4 производственных штаммов вирусов: инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальный инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота, а также культур *Pasteurella multocida* (серовары А, В, Д) и *Mannheimia haemolytica*, инактивированных формалином и адсорбированных на гидроокиси алюминия в качестве адьюванта. Формирование иммунитета наступает через 14 дней после повторной вакцинации и сохраняется в течение 8 месяцев. Данный препарат разработан ООО «Ветбиохим» и имеет существенное преимущество

щество перед своими конкурентами в том, что одновременно направлен на специфическую профилактику не только манхеймиоза и пастереллеза, но и целого ряда вирусных заболеваний, отягощающих совместное течение респираторных инфекций.

Также зарегистрированы и используются для профилактики манхеймиоза отечественные вакцины, выпускаемые ФГБУ «ВНИИЗЖ» и ФКП «Армавирская биофабрика», и ряд импортных аналогов.

## Литература

1. Biberstein E.L., Gills M., Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell. Vet. 1960; 283–300.
2. Fraser J., Donachie W., Quirie M. Rapid Indirect Hemagglutination Test for Serotyping *Pasteurella haemolytica*. Journal of clinical microbiology. 1983; 18(1): 206–207.
3. Glynn H., Wessman G.E. Rapid Plate Agglutination Procedure for Serotyping *Pasteurella haemolytica*. Journal of clinical microbiology. 1978; 142–145.
4. Kann O., Kahya S., Tayfun K. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2010; 34(1): 91–94.
5. Laishevcev A.I., Kapustin, A.V. Yakimova E.A., Luchko M.A., Pimenov N.V. Antibiotic resistance of epizootic isolates of *Mannheimia haemolytica*, allocated on the territory of the Russian Federation. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 10(70): 327–330.
6. Mehmet A., Öncel T., Sareyyüpoğlu B., Haziroğlu R., Yaşar Tel O., Cantekin Z. Vaccination studies of lambs against experimental *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* infection. Small Ruminant Research. 2006; 65: 44–50.
7. Srinand S., Hsuan S.L., Yoo H.S., Maheswaran S.K., Ames T.R., Werdin R.E. Comparative evaluation of antibodies induced by commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines using solid phase immunoassays. Veterinary Microbiology. 1996; 49: 181–195.
8. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Якимова Э.А., Лучко М.А., Пименов Н.В. Антибиотикорезистентность эпизоотических изолятов *Mannheimia haemolytica*, выделенных на территории Российской Федерации. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 10(70): 327–330.

# ЭШЕРИХИОЗ (КОЛИБАКТЕРИОЗ) ТЕЛЯТ

Капустин А.В., Лашевцев А.И.

**Эшерихиоз (колибактериоз)** телят — острое инфекционное заболевание, вызываемое энтеропатогенными штаммами *Escherichia coli*. Заболевание проявляется в виде диареи и септицемии у новорожденных телят, а также инфекции мочеполовых органов и маститов у взрослых животных. Эшерихиоз характеризуется значительным экономическим ущербом из-за высокой заболеваемости, падежа, затрат на лечение, вакцинации, диеты. У переболевших телят снижаются привесы и ухудшается конверсия корма.

**Этиология.** Возбудитель эшерихиоза — *Escherichia coli* относится к роду *Escherichia*, названному в честь немецкого педиатра Т. Эшериха. Микроорганизм представляет собой грамотрицательные факультативно-анаэробные полиморфные палочки с закругленными концами. Они не образуют спор и капсул, подвижные в большинстве случаев благодаря многочисленным жгутикам, хотя встречаются и неподвижные формы. Благоприятные условия для роста — 37°C и pH 7,0–7,2.

На сегодняшний момент известно более 9000 сероваров, из которых около 170 являются патогенными. Серотипирование включает определение О (соматического), К ( capsульного или оболочечного), Н (жгутикового) и F (фимбриальных) антигенов. Соматические антигены являются липополисахаридами и расположены на поверхности клеточной стенки. Жгутиковые антигены имеют белковую природу, а капсулярные антигены состоят из полисахаридов. Протеиновые фимбриальные антигены присутствуют у многих штаммов и действуют как адгезины, способствующие прикреплению к ворсинкам слизистой оболочки.

624

В отличие от сальмонелл лишь небольшой процент выявляемых культур *E. coli* может быть определен с доступными коммерческими диагностическими сыновротками, поскольку серотипирование ограничено изолятами доказанной или предполагаемой патогенности. В настоящее время официально признаны не менее 175 соматических типов антигенов, 80 капсульных, 56 жгутиковых, а также более 20 фимбриальных антигенов [5].

Патогенные штаммы *E. coli* обладают множеством факторов вирулентности ( capsульные полисахариды, эндотоксины, адгезины, энтеротоксины и другие секреции вещества), которые позволяют им колонизировать поверхность слизистой оболочки и впоследствии вызывать заболевание.

1. Капсульные полисахариды *E. coli* препятствуют фагоцитарному поглощению бактериальных клеток. Также они слабоантагенны, что препятствует антибактериальной эффективности системы комплемента.

2. Эндотоксин липополисахарид (*LPS*), компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, высвобождающийся при их гибели. Он состоит из липидного фрагмента, основного полисахарида и боковых цепей. Роль *LPS* в производстве болезней включает в себя пирогенную активность, повреждение эндотелия, приводящее к диссеминированной внутрисосудистой коагуляции и эндотоксический шок. Эти эффекты имеют наибольшее значение при септицемической болезни.

3. Адгезины, которые присутствуют у многих штаммов *E. coli*, позволяют клеткам прикрепляться к поверхностям слизистой оболочки тонкого кишечника

и нижних отделов мочевыделительной системы. Наиболее важными адгезивными антигенами *ETEC* у телят являются K99 (90% случаев) и F41 [2, 6, 8].

Номенклатура патогенных *E. coli* в последние годы претерпела значительные изменения. Так, термин «патотип» теперь используется для идентификации *E. coli* по наличию факторов вирулентности, способствующих возникновению болезни. Это позволяет разделить патогенные *E. coli* на группы: энтеротоксигенные эшерихии (*ETEC*), энтерогеморрагические *E. coli* (*EHEC*), энтеропатогенные *E. coli* (*EPEC*) и вне-кишечная *E. coli* (*ExPEC*) [7, 9].

*ETEC* являются наиболее важным патотипом и представлены штаммами, вызывающими секреторную диарею у животных. *ETEC* продуцирует два основных класса энтеротоксина: термолабильные (LT) и термостойкие (ST). Каждый тип энтеротоксина имеет две подгруппы: ST дополнительно разделяется на ST<sub>a</sub> и ST<sub>b</sub> на основе растворимости и биологической активности. Аналогичным образом описаны две подгруппы LT: LT<sub>I</sub> и LT<sub>II</sub>. Большинство штаммов *ETEC* производят LT<sub>I</sub>, который способствуют гиперсекреции жидкости в кишечнике [7, 8].

Энтеропатогенные эшерихии (*EPEC*) часто являются причиной поражения органов ЖКТ у телят, в основном толстого отдела кишечника. Эти бактерии не имеют факторов адгезии, но благодаря сложной системе секреции эффекторных белков могут прикрепляться к энteroцитам хозяина, разрушают микроворсинки слизистой оболочки. Также многие культуры *EPEC* образуют веротоксины, что, помимо характерных признаков эшерихиоза, приводит к проявлению нервных явлений.

Септическую форму эшерихиоза у телят вызывают эшерихии гетерогенных групп (*ExPEC*), как правило, пред-

ставленные серогрупп O78, O115, O137 и др. Как правило, они обладают большим количеством факторов вирулентности, порой сильно различающихся у разных штаммов. Развитие септицемии при эшерихиозе, как правило, связано с получением малого количества колоstralьных антител и высокой бактериальной нагрузкой.

Также необходимо обращать особое внимание при выявлении у телят энтерогеморрагических эшерихий (*EHEC*), производящих шиго-подобные токсины, к которой, например, относится O157:H7. Для телят эшерихии этой группы слабопатогенны и не причиняют вреда здоровью, но скот длительное время остается носителем и представляет высокую опасность для населения.

Эшерихии хорошо растут на обычных питательных средах: при культивировании на агаризованных средах при 37°C в течение 18–24 часов образуют слизистые, ровные, гладкие колонии. На среде Эндо колонии *E. coli* становятся ярко-красного цвета с металлическим блеском, на среде XLD — желтые, на среде Левина колонии темно-фиолетового или черного цвета. Встречаются культуры, обладающие гемолитической активностью. Все эшерихии — каталаза-положительные и оксидаза-орицательные, 99% штаммов являются индол-положительными и не образуют сероводород.

Помимо биохимических свойств, патогенные *E. coli* могут быть идентифицированы серологически, так как заболевание ассоциировано со сравнительно небольшим количеством специфических О-серогрупп. В РФ ветеринарная биологическая промышленность выпускает набор агглютинирующих О-коли сывороток, предназначенный для типизации 36 серотипов *E. coli*. Используя диагностические сыворотки против наиболее распространенных серогрупп, можно

быстро подтвердить предполагаемый диагноз.

Еще одним способом быстрого подтверждения диагноза является постановка реакции агглютинации с антиадгезивными сыворотками. Для идентификации используют свежие живые культуры, выращенные на средах, препятствующих образованию капсулых антигенов. В случае выраженной агглютинации с оценкой на 2–4 креста с одним из адгезивных антигенов (K88, K99, F41, F18, A20, 987Р) диагноз на эшерихиоз считают подтвержденным.

Механизм патогенности *E. coli*, вызывающих диарею у новорожденных, был детально изучен многочисленными исследователями в середине прошлого века, что позволило создать вакцину на основе очищенных адгезивных антигенов, обеспечивающую колостральный иммунитет у телят, получивших своевременно необходимое количество молозива от вакцинированных коров.

**Эпизоотология.** Эшерихиоз широко распространен в различных странах, занимающихся скотоводством. Взрослые животные являются основными бактерионосителями, выделяющими возбудитель в окружающую среду. Эшерихии содержатся в фекально загрязненном корме, воде и окружающей среде пометений, длительно оставаясь жизнеспособными в широком диапазоне температур. С контаминированной подстилки бактерии попадают на кожу и вымя коров, а затем контаминируют молоко. Также возможно распространение патогенной кишечной палочки через аэрозоли, транспортные средства, других животных [3, 11].

Колонизация кишечного тракта эшерихиями происходит вскоре после рождения. Большинство *E. coli* являются симбионтами и не имеют факторов вирулентности. Но часть культур, имею-

щих факторы патогенности, может вызывать оппортунистические инфекции различной локализации, в частности патологии молочной железы или мочевыводящих путей. Вирулентные штаммы обычно не являются нормальной флорой здоровых животных, а инфекция возникает в результате заноса возбудителя с клинически или субклинически больными животными [10].

**Патогенез.** Развитие инфекционного процесса зависит в первую очередь от свойств возбудителя, а также от возраста и физиологического состояния восприимчивых животных. Механизм развития эшерихиоза в целом имеет следующую схему: патогенная *E. coli* адгезируется на рецепторах микроворсинок энтероцитов, колонизирует эпителий, размножается и продуцирует энтеротоксины, вызывающие чрезмерную секрецию жидкости и электролитов эпителиальными клетками, которые значительно превосходят поглощающую способность, приводя к выходу тканевой жидкости в просвет кишечника. Начавшаяся диарея может быстро привести к потере животным до 40% массы тела. Энтеротоксины, эндотоксины и/или адгезины могут также повредить микроворсинки и энтероциты, что в последующем ведет к уменьшению поглощения электролитов и воды в толстом кишечнике. На фоне повреждения эпителиальных клеток может развиться септицемия. Диарея обычно продолжается до тех пор, пока не наступит летальный исход в результате обезвоживания и метаболического ацидоза или терминальной септицемии [1].

**Клинические признаки.** Эшерихиоз у новорожденных телят (неонатальная диарея) в подавляющем большинстве случаев протекает в энтеритной форме с выраженной диареей.

Неонатальную диарею у телят с первого по четвертый день жизни вызывают штаммы *ETEC*. Возбудитель попадает в

организм сразу после рождения с молозивом, с кожи сосков и предметов окружающей среды. Наличие адгезивных антигенов позволяет *ETEC* прикрепляться к энтероцитам тонкого кишечника, где они быстро размножаются, продуцируя различные токсины. Тяжесть болезни во многом зависит от напряженности колострального иммунитета. В случае содержания молодняка в хороших санитарных условиях диарея может проходить в легкой форме и заканчиваться самостоятельно. При тяжелом течении диарея становится изнуряющей и быстро приводит к обезвоживанию. Цвет фекалий может быть желтым или бело-серым. У больного теленка выражено угнетение, животное истощенно, глаза впальные, кожа становится сухой и приобретает серый оттенок. Данная форма болезни обычно заканчивается летально. При менее выраженной дегидратации и надлежащем лечении телята могут восстанавливаться с минимальными последствиями [4, 5].



Рис. 1. Диарея у новорожденного теленка, вызванная *ETEC*



Рис. 2. Коматозное состояние у теленка 3-дневного возраста на фоне диареи и обезвоживания

Септицемия, вызванная патогенными *E. coli*, может быть первичной, возникающей спорадически у новорожденных телят, не получивших молозиво, или вторичной, на фоне вирусных заболеваний. Эшерихии проникают через слизистые оболочки кишечника, накапливаются и размножаются в брызговых лимфатических узлах, далее инфекция может перейти в генерализованную форму с развитием септицемии, полисерозита, пневмонии, менингита, артрита и т.д. Клинически септическая форма эшерихиоза может проявляться атаксией, анорексией, затрудненным дыханием, хромотой. Болезнь развивается стремительно, больное животное погибает в течение 24–48 часов после появления клинических признаков [5].

**Патологоанатомические изменения.** Характерных изменений при диарейной форме эшерихиоза практически не наблюдается, поскольку энтеротоксины не проникают в клетки энтероцитов организма-хозяина и не вызывают их повреждения. Ткани и органы павших телят обезвожены, просвет кишечника расширен и заполнен жидкими фекалиями с большим количеством слизи, пузырьков газа и хлопьев казеина, слизистая тонкого кишечника отечная. Также может наблюдаться расширение желудка, содержащего непереваренное моло-

ко, венозные кровоизлияния на большей кривизне желудка. При микроскопическом исследовании на слизистой тощей и подвздошной кишок обнаружаются многочисленные слои *E. coli*, покрывающие крипты и кончики ворсинок.

**Диагностика.** Постановка диагноза «эшерихиоз» основана на анализе эпизотических данных, оценке клинико-морфологического проявления заболевания, а также проведении лабораторно-диагностических исследований, проводимых в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», 2000 г. Диагноз должен быть обязательно подтвержден лабораторно путем выделения чистой культуры возбудителя, обладающей соответствующими факторами вирулентности. Эшерихиоз считается установленным в трех случаях: если выделенные культуры эшерихий типируются до серотипа имеющимися диагностическими О-агглютинирующими сыворотками; если имеются адгезивные антигены, которые также выявляются постановкой РА с антиадгезивными сыворотками; в случае, если культура не идентифицирована, но обладает патогенностью и вызывает гибель зараженных белых мышей.

Использование многих современных методов диагностики, например Малди Тоф, при эшерихиозе является малоинформативным, поскольку позволяет определить вид микроорганизма, но не выраженность факторов вирулентности.

Еще одним широко применяемым экспресс-методом постановки диагноза является использование иммунохроматографических тестов. Наборы включают тест-полоски для выявления антигенов ротавируса, коронавируса, адгезивного антигена *E. coli* K99 и *C. parvum*.

Дифференциальная диагностика очень важна при постановке диагноза на эшерихиоз, поскольку расстройства

ЖКТ у телят может иметь как инфекционную, так и незаразную этиологию.

В первую очередь стоит исключить токсическую диспепсию, возникающую при выпаивании телятам молозива от больных маститом коров, содержащего антибиотики или кетоновые тела. К заболеванию и даже смерти может привести нарушение технологии поения телят, при котором молоко попадает в рубец, что ведет к образованию казеинобезоаров.

Из инфекционных заболеваний наиболее распространенными и опасными являются:

— ротавирусная инфекция — широко распространенная остропротекающая высококонтагиозная болезнь телят до 10-дневного возраста. Вирус передается алиментарным путем от больных телят при непосредственном контакте с новорожденными. Патогенность вируса зависит от многих факторов, таких как доза заражения, особенность конкретного штамма, возраст животного, а также осложнения бактериальной микрофлорой.

— коронавирусная инфекция — болезнь телят в возрасте 7–20 дней. Основные поражения обнаруживаются на слизистой прямой кишки, что ведет к обезвоживанию и даже гибели животного. Коронавирус может также размножаться в эпителии респираторного тракта, что способствует развитию бактериальной микрофлоры (пастереллы, манхеймии, микоплазмы и др.) и ведет к развитию пневмонии у телят.

К опасным, но менее распространенным инфекционным болезням новорожденных телят также следует отнести анаэробную энтеротоксемию, крипто-споридиоз, реовирусную инфекцию и некоторые другие.

**Специфическая профилактика** является наиболее надежным способом борьбы с эшерихиозом телят. В РФ за-

регистрированы целый ряд как отечественных (Комбовак-К, Вероколивак и др.), так и импортных вакцин для предотвращения этого заболевания. Механизм действия указанных препаратов идентичный: двукратная иммунизация стельных коров и нетелей обеспечивает образование высокого титра специфических антител, блокирующих адгезию эшерихий в кишечнике, что предотвращает развитие болезни.

Основным требованием для получения ожидаемого результата является своевременная выпойка новорожденным достаточного количества молозива, полученного от иммунизированных коров и нетелей. Это позволяет создать у телят колостральный иммунитет высокой степени напряженности и предотвратить развитие эшерихиоза. Коров иммунизируют дважды за 3–4 недели перед каждым отелом.

Перед выпойкой молозиво новородившейся коровы обязательно должно быть проверено на мастит любым из имеющихся тестов. Использовать молозиво можно лишь при отрицательной реакции, то есть отсутствии гелеобразования. В случае заболевания коровы маститом теленку выпаивают молозиво от здоровой коровы, для чего на ферме необходимо иметь банк замороженного молозива. Для этого отбирают излишки молозива у здоровых коров от первой дойки, разливают его по чистым пластиковым бутылкам объемом 2 л и замораживают при минус 18–20°C. Срок хранения замороженного молозива может быть до полугода. Перед выпойкой теленку молозиво размораживают на водяной бане при температуре примерно +40°C. Очень важно и время получения теленком первой партии молозива — оно не должно превышать 30–40 минут.

Помимо вакцинации глубокостельных коров, для оздоровления хозяйства от эшерихиоза проводят комплекс ве-

теринарно-санитарных мероприятий, которые складываются из тщательного соблюдения зоогигиенических и ветеринарных правил содержания и кормления животных. Индивидуальное содержание, тщательная уборка и дезинфекция, устранение «человеческого» фактора при выпойке телят предупреждают передачу возбудителя от больного здоровому и снижают риск заболевания эшерихиозом.

Дезинфекция помещения для телят должна проводиться каждый раз после перевода теленка в старшие группы. При этом клетку или домик необходимо тщательно почистить, затем помыть и после этого продезинфицировать. Для дезинфекции помещений используют формальдегид, хлорную известь, едкий натрий, которые инактивируют возбудитель за 15–20 минут.

Соблюдение перечисленных правил позволяет в подавляющем большинстве случаев обеспечить снижение заболеваемости до 95% у телят в возрасте от 0 до 21 дня жизни и обеспечить сохранность до 99%.

**Лечение.** Лечение диареи у телят должно начинаться незамедлительно и включать в себя применение антимикробных препаратов, иммуностимуляторов, сорбентов, а также препаратов регидратационной терапии. Эффективно также использование специфической антитоксической сыворотки, введение которой нейтрализует действие поступивших в кровь токсинов и блокирует развитие болезни. В настоящее время для терапии и профилактики эшерихиоза выпускаются ряд препаратов, как в моноварианте (только эшерихиоз), так и в ассоцииированном, например гипериммунная лечебная сыворотка против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Препарат изготовлен из сыворотки крови клинически

здоровых волов-продуцентов, гипериммунизированных смесью инактивированных антигенов *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Escherichia coli* серогрупп O115 и O78, адгезивных антигенов K88, K99, 987P, F41, ТЛ- и ТС-анатоксины *Escherichia coli*, вирусов парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита штамм.

Гипериммунная сыворотка способствует формированию пассивного иммунитета к перечисленным возбудителям, напряженность которого составляет 10 дней. Механизм действия сыворотки основан на связывании и нейтрализации патогенных антигенов специфическими антителами биопрепарата. Гипериммунная сыворотка эффективна для лечения указанных заболеваний, особенно на ранних стадиях инфекционного процесса и хорошо сочетается с препаратами, применяемыми для симптоматического лечения (противомикробные препараты и пробиотики).

## Литература

1. Зароза В.Г. Эшерихиоз телят. ВАСХНИЛ. М.: Агропромиздат, 1991; 238.
2. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 27.07.2000.
3. Олейник А.В. Расстройства ЖКТ у телят раннего возраста. Ветеринария Кубани. 2009; 1: 9–11.
4. Cornick N.A. et al. Persistent Colonization of Sheep by *Escherichia coli* O157: H7 and other *E. coli* pathotypes. Applied and environmental microbiology. 2000; 11: 4926–4934.
5. Dubreuil J.D. *Escherichia coli* STb enterotoxin. Microbiology. 1997; 6: 1783–1795.
6. Edrington T.S. et al. Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in ruminants: a new hypothesis. Foodborne Pathogens & Disease. 2006; 4: 413–421.
7. Gyles C.L., Fairbrother J.M. *Escherichia coli*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Blackwell Publishing. Singapore. 2010; 267–308.
8. Lallier R. et al. Isolation and purification of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin of porcine origin. Analytical biochemistry. 1982; 2: 267–275.
9. Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews. 1998; 1: 142–201.
10. Ochoa T.J., Cleary T.G. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. Current opinion in infectious diseases. 2003; 3: 259–263.
11. Strockbine N.A. et al. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157: H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infection and immunity. 1986; 1: 135–140.

# ЛЕПТОСПИРОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Соболева Г.Л., Концевая Н.Н.

**Определение болезни.** Лептоспироз — группа нетрансмиссивных природно-очаговых инфекций, занимающая первое место среди зоонозов по широте распространения природных и антропургических очагов. Убiquитарное распространение связывают с широким спектром резервуарных хозяев патогенных лептоспир и восприимчивых к ним видов животных.

В официальных документах есть и другое определение болезни, например «лентоспироз — зоонозная природно-очаговая инфекционная болезнь диких и домашних животных, а также человека, широко распространенная в различных ландшафтно-географических зонах мира» [41].

Между этими определениями нет принципиальных различий, и акцент делается на широкой распространенности болезни, природной очаговости, вовлеченностя домашних животных и человека в инфекционный процесс, кроме того, и в одном, и в другом случае отсутствуют описания клинических проявлений, что является не случайным.

По определению медицинских специалистов лептоспирры являются возбудителями группы природноочаговых нетрансмиссивных зоонозов, имеющих широкое распространение и представляющих серьезную проблему для медицинского и ветеринарного здравоохранения во многих странах мира.

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения [106], «лентоспироз относится к зоонозам с мировым распространением; наиболее высокий уровень эпидемического проявления отмечается в странах с влажным субтропическим и тропическим кли-

матом. Заболеваемость характеризуется выраженной сезонностью, часто связана с профессиональной деятельностью и может проявляться в виде вспышек. Дикие и домашние животные многих видов служат источниками возбудителей лептоспироза, относящихся к многочисленным сероварам. Инфекция передается человеку посредством прямого контакта с мочой инфицированных животных или через объекты внешней среды, контаминированные мочой животных-лептоспироносителей (главным образом через воду, почву и растения)».

Еще в 1982 году на X конференции Международного эпизоотического бюро в Лондоне было отмечено, что лептоспироз относится к числу наиболее широко распространенных природно-очаговых зоонозов и является проблемой не только экономического, но и социального плана. Несмотря на многочисленные исследования и многолетние попытки искоренения болезни с помощью превентивных и эрадикационных мер, расцвет которых пришелся на период 60—80 гг., лептоспироз и поныне остается проблемой для ветеринарных специалистов.

В ряде литературных источников, монографиях и интернет-статьях, как правило, написанных неспециалистами в области изучения лептоспир и лептоспироза и чаще носящих рекламный характер, по-прежнему при определении болезни акцент делается на клинических признаках лептоспироза у животных. Вследствие этого часть практикующих ветеринарных врачей продолжает рассматривать лептоспироз как преимущественно остро или подостро протекающую инфекцию, недооценивая при этом

роль бессимптомно переболевших животных, животных-лентоспироносителей, длительность носительства, способность возбудителя к продолжительному сохранению во внешней среде, возможность заражения неиммунных животных и повторение замкнутого цикла циркуляции возбудителя в хозяйстве. Отсутствие или несвоевременное проведение дезинфекции и дератизации в хозяйстве способствует сохранению и накоплению лентоспир во внешней среде. Подробно сроки выживания лентоспира в различных объектах внешней среды представлены в книге Ю.А. Малахова, А.Н. Панина, Г.Л. Соболевой [30] и других источниках литературы.

Проблемой лентоспироза животных в СССР и в Российской Федерации занимались С.Я. Любашенко (1940, 1948, 1950, 1965), В.И. Терских (1940, 1941, 1945), А.Г. Маявин (1956, 1963, 1964), Е.Н. Горшанова (1971), А.Н. Панин (1972–2002), Ю.А. Малахов (1974, 1975, 1978, 1979, 1992, 2001), И.А. Болоцкий (1998) и др.

История развития лентоспироза за 100 лет изложена в работе Gsell O. [69].

**Этиология.** Лентоспирсы (*leptos* — тонкая, нежная, *spira* — спираль) — группа микроорганизмов — возбудителей лентоспироза. При темнопольной микроскопии это спиралевидные, тонкие, гибкие, серебристые микроорганизмы с одним или двумя концевыми крючками (рис. 1а), в ряде случаев (при длительном культивировании в лабораторных условиях) небольшая часть штаммов имеет бескрючковые формы. Уникальная морфология и активная подвижность являются их характерным признаком и позволяют отличить их от других извитых подвижных форм спирillo- и вибриоподобных микроорганизмов и поставить диагноз по результатам проведения микроскопических исследований.



Рис. 1 а

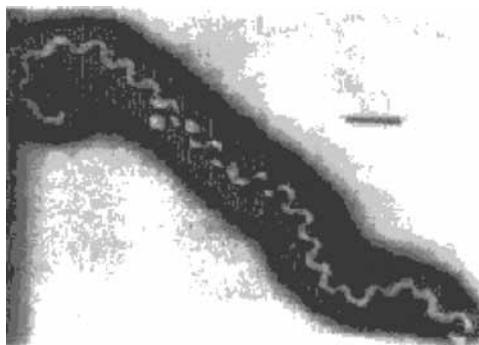


Рис. 1 б

При крайне малом диаметре (0,1–0,6 мкм) длина клетки относительно велика (3–500 мкм). Лентоспирсы не образуют эндоспор, не имеют капсулы и каких-либо включений, проходят через мелкопористые фильтры (0,2–0,45 мкм), задерживающие большинство бактерий, что используется для очистки культур от посторонней микрофлоры в случае их контаминации. В жидких средах обычными формами движения являются вращательное, прямолинейное поступательное с одновременным вращением вокруг собственной оси и круговые движения. Полагают, что активная подвижность играет важную роль в патогенезе спирохетозов

и лептоспироза в частности, способствуя проникновению возбудителей в организм хозяина и его дальнейшему распространению в органах и тканях. Лептоспирры — грамотрицательные микроорганизмы. Плохо окрашиваются анилиновыми красителями.

Более детально морфология лептоспир изучена под электронным микроскопом и представлена на рис. 16. Следует отметить, что представление об ультраструктуре лептоспир менялось по мере совершенствования электронного микроскопа. Лептоспир независимо от серовара, серогруппы и геномовида имеют одинаковое строение. Если очень коротко остановиться на ультраструктуре, то различают в строении клетки наружную оболочку (покров), осевую нить (осевая спираль, аксистиль) и цитоплазматический ци-

линдр, винтообразно закрученный вокруг осевой нити, которая считается органом движения у лептоспир. Более подробно строение лептоспир изложено в следующих работах [1, 5, 30].

Классификацию лептоспир, основанную на антигенном различии отдельных штаммов, предложили Wolff и Broom (1954) и описали 34 серотипа, разделенных на 12 серологических групп. Эта классификация была принята Международным подкомитетом по таксономии и номенклатуре ВОЗ и, совершенствуясь, существует в наши дни. Список, опубликованный научной группой ВОЗ в 1975 году, включал уже 124 серовара патогенных лептоспир, разделенных на 18 серологических групп. В настоящее время количество сероваров патогенных лептоспир, разделенных на 25 серогрупп, превышает,

## Классификация лептоспир

## Порядок - SPIROHAETALES

## **Семейство - LEPTOSPIRAECEAE**

РОД: - *Turneria* (L. *parva*)  
- *Leptonema* (L. *illini*)  
- *Leptospira*

**Виды:** *Leptospira interrogans*

### *Leptospirabiflexa*

Icterohaemorrhagiae	- 1915	Djasiman	- 1939
Hebdomadis	- 1918	Sarmin	- 1939
Autumnalis	- 1923	Mini	- 1941
Pyrogenes	- 1923	Tarassovi	- 1941
Bataviae	- 1926	Ballum	- 1944
Grippotyphosa	- 1928	Celledoni	- 1956
Canicola	- 1933	Louisiana	- 1964
Australis	- 1937	Panama	- 1966
Pomona	- 1937	Ranarum	- 1972
Javanica	- 1938	Manhao	- 1978
Sejroe	- 1938	Shermani	- 1982
Cynopteri	- 1918		

> 300 серверов

25 easy ways

Рис. 2

по данным разных источников, 230–300 наименований [92]. Серогруппа — понятие условное, но им продолжают оперировать при решении вопросов как диагностики, так и специфической профилактики.

В 1982 году Международный подкомитет по таксономии лептоспир и спирохет выделил лептоспир в самостоятельное семейство *Leptospiraceae* в порядке *Spirochaetalis*. В него включен род *Leptospira*, объединяющий 2 вида: *L. interrogans* (позднее — *Leptospira interrogans sensu lato*) — патогенные лептоспир, резервуаром которых являются животные-носители, и *L. biflexa* (позднее — *Leptospira biflexa sensu lato*) — лептоспир-сапрофиты, средой обитания которых является вода (в том числе морская) естественных или искусственных водоемов и увлажненная почва. Морфологически патогенные и свободноживущие лептоспир неотличимы. Критерии видовой дифференциации патогенных и сапрофитных лептоспир изложены в монографии Берджи (1983).

Таксономическое положение лептоспир согласно классификации, основанной на антигенной структуре, представлено на рис. 2.

Таблица 1.

Класс	<i>Spirochaetes</i>		
Порядок	<i>Spirochaetales</i>		
Семейство	<i>Spirochaetaceae</i>		
Род	<i>Leptospira</i>		
Геномные виды* <i>Picardaeu</i> (2012)	Патогенные: 9	Промежуточные: 5	Сапрофитные: 6
	<i>L. interrogans</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. vanhielii</i>
	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. wolbachii</i>
	<i>L. borgpeterseni</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. biflexa</i>
	<i>L. alexanderi</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. terpstrae</i>
	<i>L. alstonii</i>	<i>L. wolfii</i>	<i>L. meyeri</i>
	<i>L. kmetyi</i>		<i>L. yanagawai</i>
	<i>L. noguchi</i>		
	<i>L. santarosai</i>		
	<i>L. weilii</i>		

В последние годы международным подкомитетом по таксономии предложена альтернативная система видовой классификации лептоспир, основанная на новой концепции определения вида у эубактерий, в соответствии с которой к одному виду относят штаммы с ДНК-ДНК гомологией более 70%. На основании проведенных опытов по гибридизации ДНК более 200 штаммов патогенных лептоспир различных сероваров выделены в 9 геномных видов, степень гомологии между которыми варьирует от 7 до 56% [94]. Таксономическое положение лептоспир согласно геномной классификации представле-но в табл. 1.

По данным Эллиса [81], существуют различия в глобальном распространении некоторых геномных видов лептоспир, например *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* и *L. kirschneri* получили широкое рас-пространение, тогда как виды *L. noguchi* и *L. santarosai* циркулируют главным образом в Северной и Южной Америке, а *L. weilii* — в Китае и Восточной Азии. Заражение крупного рогатого скота, как правило, вызвано лептоспирами геном-ных видов *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* и *L. kirschneri*.

Таблица 2.

Геномовид	Серогруппа	Серовар	Основные хозяева лептоспир
<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i> <i>icterohaemorrhagiae</i>	серая, черная крыса —>—
<i>L. interrogans</i>	<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>	собака
<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	<i>bratislava</i>	европейский еж
<i>L. interrogans</i>	<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>	мышь-малютка
<i>L. interrogans</i> —>>—	<i>Pomona</i> —>>—	<i>pomona</i>	KPC
<i>L. kirschneri</i>	—>>—	<i>monjakov</i> <i>mozdok</i>	свинья полевая мышь
<i>L. interrogans</i> —>>—	<i>Sejroe</i> ** —>>—	<i>saxkoebing</i> <i>hardjo</i> <i>sejroe</i>	серые полевки KPC домовая мышь
<i>L. borgpeterseni</i>	<i>Javanica</i> —>>—	<i>poi</i> <i>hanka</i> *	землеройка-буровзубка полевая мышь
<i>L. borgpeterseni</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	свинья, KPC
<i>L. kirschneri</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>erinacei auriti</i>	ушастый еж
<i>L. kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>	серые полевки обский лемминг крупный и мелкий рогатый скот, лошади

\* эндемик, циркуляция лептоспир серовара *hanka* среди полевых мышей установлена только в природных очагах Приморского края.

\*\* по старой номенклатуре — серогруппа *Hebdomadis*.

Однако независимо от классификации серовар является основной таксономической единицей у лептоспир.

На территории России установлена циркуляция патогенных лептоспир, относящихся к 3 геномным видам и 16 сероварам (*L. interrogans* — серовары *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *bratislava*, *bataviae*, *pomona*, *monjakov*, *hardjo* и *saxkoebing*, *L. kirschneri* — *mozdok*, *grippotyphosa* и *erinacei auriti* и *L. borgpeterseni* — *tarassovi*, *sejroe*, *poi* и *hanka* \*), представленным в табл. 2.

Следует отметить, что серовары лептоспир разных серогрупп могут принадлежать к одному геномному виду лептоспир и, наоборот, серовары одной серогруппы могут принадлежать к разным геномным видам лептоспир. В повседневной работе мы, как правило, оперируем понятием серогруппа, хотя не забываем, о чём сказали ранее: что основной таксономической единицей является серовар и иммунитет создается на уровне сероваров.

Распространенность и этиологическая структура лептоспироза изучаются во всех странах мира, как правило, на уровне серологических групп, реже сероваров, с целью:

- установить широту циркуляции возбудителей лептоспироза на тех или иных территориях;
- своевременного выявления новых сероваров и серогрупп лептоспир в связи с трансграничными перевозками животных;
- установить соответствие этиологической структуры лептоспироза составу средств специфической профилактики;
- проследить наличие эпизоотических и эпидемических связей, т.к. лептоспироз является зоонозной болезнью, и поиск источника возбудителя инфекции является очень важным в плане проведения противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий.

Наиболее распространеными на территории Российской Федерации среди животных разных видов являются леп-

тоспирсы серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Tarassovi* и *Canicola*. По данным литературы, являясь достаточно стабильной, этиологическая структура лептоспироза у животных разных видов тем не менее подвержена серьезным изменениям. Наиболее существенные изменения отмечают в Российской Федерации в этиологической структуре лептоспироза свиней и собак [30, 39], однако у крупного рогатого скота мы также видим качественные и количественные изменения этиологической структуры.

Динамика изменения этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота в нашей стране представлена в табл. 3.

**Таблица 3. Динамика изменения этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота в СССР и РФ (1963–2016 гг.)**

Годы	Исследовано	В том числе с лептоспиралами серогрупп, %							
		<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Canicola</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Hebdomadis</i>	<i>Sejroe</i>	<i>Pomona</i>	<i>Tarassovi</i>	Смешанные реакции
1963–1972*	300817	2,7	0,7	11,7	47,7		16,7	11,6	8,9***
1990–1999**	7306805	2,1	0,4	6,0	27,3	34,1	6,7	11,0	12,4
2007–2016****	5683764	6,1	0,9	7,3	11,1	14,1	7,9	7,8	44,8

\* диагностический титр у КРС 1:500;

\*\* диагностический титр 1:50–1:100;

\*\*\* лептоспирсы редких серогрупп — 5,7%, смешанные реакции — 3,2%;

\*\*\*\* данные любезно предоставлены ЦНМВЛ (г. Москва).

За три представленных в табл. 3 периода (1963–2016 гг.), каждый из которых представлен выборкой продолжительностью в 10 лет, исследовано в целом более 13 млн голов крупного рогатого скота. Системный подход к изучению этиологической структуры лептоспироза в нашей стране начат Малаховым Ю.А.,

который обобщил данные ветеринарных лабораторий за период 1963 по 1972 гг. и которые мы принимаем за отправную точку. В этот период этиология лептоспироза у крупного рогатого скота представлена лептоспиралами серогрупп *Hebdomadis* (47,7%), *Pomona* (16,7%), *Tarassovi* (11,6%), *Grippotyphosa* (11,7%) [10, 24, 44]. Позднее ввиду антигенной неоднородности и большого количества сероваров, количество которых превысило 50 наименований, серогруппа *Hebdomadis* Комитетом по таксономии ВОЗ (1983) разделена на три самостоятельные группы: *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Mini*. Отмечена широкая инфицированность крупного рогатого скота лептоспиралами серогрупп *Hebdomadis* и *Sejroe*

(серовар *hardjo*), установлена их роль в патологии воспроизводства. В последнее изученное десятилетие в этиологической структуре лептоспироза КРС в РФ максимальное количество положительных реакций по-прежнему приходится на лептоспиралы серологических групп *Sejroe* (14,1%) и *Hebdomadis* (11,1%). На

долю лептоспир серогрупп *Grippotyphosa*, *Tarassovi* и *Pomona* приходится соответственно 7,3; 7,8 и 7,9%. По разным регионам количество положительных реакций с лептоспиринами данных серогрупп может варьировать как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

Основными возбудителями лептоспироза у крупного рогатого скота на уровне сероваров являются лептоспирсы *hardjo* серогруппы *Sejroe*, *pomona*, *grippotyphosa* и *tarassovi* одноимённых серогрупп (табл. 2). Они встречаются на всей территории России и во многих странах. Первый вызывает abortionы, преждевременные роды и мертворождаемость, второй, кроме того, — спорадические вспышки иктерогемоглобинурии у телят [11, 30, 55].

В отношении лептоспир серогруппы *Icterohaemorrhagiae* следует отметить, что нами неоднократно отмечался существ-

венный рост положительных реакций в РФ с лептоспиринами этой серологической группы у свиней и собак [9, 14, 39, 44, 45, 49], однако у крупного рогатого скота в эти же периоды количество положительных реакций с иктерогеморрагическими лептоспиринами возросло не столь существенным образом и достигло 6,1%. Динамика изменения этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота отображена на рис. 3.

Необходимо сказать, что об увеличении количества серологических реакций с иктерогеморрагическими лептоспиринами сообщали во многих странах, однако количество бактериологических находок лептоспир данной серогруппы достаточно небольшое. Серовары *copenhageni* и *icterohaemorrhagiae* могут быть вовлечены в инфекционный процесс при инфицировании окружающей среды мочой крыс (табл. 2), являющихся



Рис. 3

ся основным хозяином лептоспир этих сероваров [1, 2, 98]. Следует полагать, что процесс адаптации лептоспир этих сероваров к организму свиней и собак происходит быстрее, чем к организму крупного рогатого скота.

Лептоспирсы серогруппы *Canicola* могут вызывать эпизоотии лептоспироза у крупного рогатого скота с охватом значительного количества животных и, кроме того, участвовать в эпидемиологическом процессе. Так, в Ульяновской области и в Краснодарском крае зарегистрированы водные «купальные» вспышки лептоспироза *Canicola*, при которых роль основного источника возбудителя инфекции играл не основной хозяин — собака, а крупный рогатый скот [37, 42].

За рубежом, помимо лептоспир перечисленных серогрупп, от крупного рогатого скота выделены лептоспирсы серологических групп *Australis*, *Autumnalis* (Япония, 1953, 1960), *Bataviae* (Китай, 1960; Куба, 1978), *Pyrogenes* (Австралия, 1996), *Ballum* (Новая Зеландия, 1973). Лептоспирсы сероваров *hardjo* (*Sejroe*) и *rotunda* (*Pomona*) выделены практически повсеместно.

Комитет Ассоциации охраны здоровья животных в США проследил историю изучения лептоспироза крупного рогатого скота с 1960 по 1980 гг. и определил следующие её периоды: 1) рост положительных реакций с лептоспирарами серогруппы *Sejroe*; 2) выделение штаммов серовара *hardjo*; 3) использование более специфичных антигенов в РМА; 4) снижение заболеваний, вызванных лептоспирарами серогруппы *Pomona*, и подъем заболеваемости, связанной с сероваром *hardjo*; 5) появление рекомендаций о создании новых вакцин [30].

Подтверждением значимости и повсеместности циркуляции лептоспир серовара *hardjo* серогруппы *Sejroe* служит выделение штаммов данного серовара от крупного рогатого скота в разных странах

и на разных континентах (США, Канада, Перу, Аргентина, Колумбия, Италия, Великобритания, Ирландия, Югославия, СССР, Новая Зеландия, Австралия т.д.). Количество бактериологических находок у крупного рогатого скота лептоспир серовара *hardjo* постоянно увеличивается, о чем свидетельствуют данные литературы. В меньшей степени от крупного рогатого скота в разные периоды выделяли и лептоспир других сероваров серогрупп *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Mini*, таких как *hebdomadis* (Конго, Индия, Япония, СССР), *sejroe* (Великобритания, СССР), *balcanica* (СССР), *kremastos* (Япония), *szwajizak* (США), *goiano* (Бразилия), *guaricurus* (Бразилия), *mhoy* и *marondera* (Зимбабве). Количество таких находок весьма ограничено и, по всей вероятности, не представляет эпизоотической значимости. Так, Kingscote (1985) отмечает, что антитела к лептоспирям *hardjo* и *sejroe* обнаруживают по всей Канаде. Для оценки значимости этих лептоспир в патологии у крупного рогатого скота автор обследовал шесть стад. Лептоспирсы серовара *hardjo* выделены во всех 6 стадах из проб мочи (8 из 46), почек (9 из 18) и в одном случае — из спинномозговой жидкости. Основанием для обследования стад послужило наличие большого количества положительных реакций, маститы и abortiones. Роль серовара *sejroe* не подтверждена бактериологическими находками, реакции являются перекрестными между двумя сероварами одной серогруппы. Хронологические аспекты и обстоятельства выделения лептоспир разных сероваров серогрупп *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Mini* представлены в работах Панина А.Н. [38], Kmety E., Dikken H. [87], Малахова Ю.А., Панина А.Н., Соболевой Г.Л. [30]. Выделение большого количества лептоспир данных серогрупп в период 60–80 гг. связано с появлением в это время питательных сред, обеспечивающих рост

более капризных в своих потребностях лептоспир. Представление о широте распространения лептоспир разных серогрупп дают результаты серологических исследований. Однако следует отметить: вообще и в частности это касается лептоспир серогрупп *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Mini*; представления о циркулирующих сероварах с помощью РМА получить не представляется возможным. С появлением питательных сред, обеспечивающих выделение лептоспир серогрупп *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Mini*, *Ellis* [72, 73] удалось опровергнуть сложившуюся точку зрения, что основными возбудителями аборта в Северной Ирландии у крупного рогатого скота являются лептоспирсы серогрупп *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* и редко серовар *hardjo*. Он обнаружил лептоспирсы в abortированных плодах у 41,6% из 245 обследованных животных. Из 58 изученных изолятов к серовару *hardjo* отнесены 56, к *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae* — по одному.

Этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота в Европе представлена, кроме перечисленных, в ряде случаев лептоспираторами серогруппы *Australis*. По данным презентации N. Ponti et al. [96], инфицированность крупного рогатого скота лептоспираторами на Сардинии составляла 19,0%, в этиологической структуре лептоспироза данного вида животных доминирующими являлись лептоспирсы серогруппы *Pomona*, на долю которых приходилось 58% положительных реакций (рис. 4). Доля лептоспир серогрупп *Sejroe* (*hardjo*) и *Australis* составляла соответственно 40% и 12%. По более поздним сообщениям Mario D'Incau [88], в целом по Италии за период 2012–2016 гг. инфицированность крупного рогатого скота составляла более 5%, в этиологии доминировали лептоспирсы серогрупп *Sejroe*, *Pomona* и *Icterohaemorrhagiae*. В Италии не зарегистрирован лептоспироз, вызванный лептоспираторами серогруппы *Grippotyphosa*.



Рис. 4

В Германии, по данным серологических исследований сыворотки крови крупного рогатого скота, доминировали лептоспирсы серогрупп *Pomona* — 63,2%, *Grippotyphosa* — 14,15% и *Icterohaemorrhagiae* — 9,23%.

В странах Северной Америки основными возбудителями лептоспироза у крупного рогатого скота являлись лептоспирсы серогрупп *Sejroe* и *Pomona*; на Кубе — *Canicola*, в меньшей степени — *Tarassovi* и *Grippotyphosa*; в Мексике — *Tarassovi*.

В странах Южной Америки основными возбудителями были лептоспирсы серогрупп *Hebdomadis*, *Sejroe* и *Pomona*, в Колумбии — *Canicola*.

В Австралии лептоспироз имеет достаточно широкое распространение. Возбудителями являются лептоспирсы двух серогрупп: *Canicola* и *Sejroe*.

На Африканском континенте информации о распространении лептоспироза крупного рогатого скота недостаточно, но по ряду стран специфические антитела обнаружены к лептоспирям серогрупп *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* и *Louisiana* [30].

Следует еще раз остановиться на том, что в странах с тропическим и субтропическим климатом видовой состав основных хозяев патогенных лептоспир достаточно обширный, и количество сероваров лептоспир является также многообразным и отличным по составу от РФ, а предоставленная выше информация дает нам представление только о серогрупповом составе лептоспир.

Таким образом, этиология лептоспироза крупного рогатого скота отличается по странам и континентам по серогрупповому составу и уж тем более по серовариантному, однако во всех регионах мира основным возбудителем лептоспироза крупного рогатого скота на современном этапе являются лептоспирсы серологической группы *Sejroe*, в частности серовар *hardjo*. Лептоспир относят к возбудите-

лям группы высокого риска в отношении вероятности трансграничного перемещения с представителями дикой фауны и не только [2, 6].

Кроме того, несмотря на наличие сероваров-эндемиков, отмечают, что практически серологическую диагностику, которая нам дает представление об этиологической структуре лептоспироза на той или иной территории, необходимо подкреплять и бактериологическими находками, однако далеко не все лаборатории владеют методами бактериологической диагностики применительно к возбудителю лептоспироза.

## Эпизоотология

Восприимчивы к лептоспирозу все виды домашних и более 130 видов диких животных, которые служат источником возбудителей лептоспир, относящихся к многочисленным сероварам, а также человек [1, 2, 6, 104]. Очаги лептоспирозной инфекции подразделяют на природные, антропургические и смешанные. Природные очаги лептоспироза хорошо представлены в книгах Ананьина В.В. и Киктенко В.С. [1, 22].

Основными хозяевами (резервуарами) и источниками возбудителя инфекции среди диких млекопитающих в природе являются грызуны (серые полевки, мыши, крысы) и насекомоядные (ежи, землеройки) (рис. 5–8). Грызуны обладают высокой восприимчивостью к лептоспирозу и играют ведущую роль в поддержании эпизоотического процесса в природном очаге.

Антропургические очаги лептоспироза, как правило, возникают на территориях, прилегающих к природным очагам (рис. 9–10), формируются в непосредственной близости к местам обитания человека и связаны с его деятельностью, в т.ч. профессиональной [35].



Рис. 5–8

В антропургических очагах основным хозяином (резервуаром) и источником возбудителя инфекции являются домашние животные — собаки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, реже козы и лошади, а также пушные звери клеточного содержания — лисицы, песцы, нутрии. Болеют животные лю-

бого возраста, но молодые особи более восприимчивы и болезнь у них протекает тяжелее, чем у взрослых.

В смешанных очагах (природно-антропургические и синантропно-урбанистические), которые характерны для крупных городов и мегаполисов, основными источниками leptospiroz-



Рис. 9–10

Таблица 4. Динамика инфицированности крупного рогатого скота лептоспираторами в СССР и РФ в период с 1963 по 2016 гг.

Годы	Исследовано животных	% инфицированных
1963–1972*	300 817	15,1
1990–1999**	7 306 805	17,8
2007–2016**	5 683 764	10,1

\* диагностический титр 1:500;

\*\* диагностический титр 1:50–1:100.

ной инфекции являются серые крысы, полевые мыши, владельческие и безнадзорные собаки [34, 56] или объекты внешней среды, контактированные мочой грызунов-лептоспироносителей [57, 70]. При этом инфицированность грызунов была подтверждена лабораторными методами исследования.

В России лептоспироз животных, в том числе и крупного рогатого скота, регистрируют практически во всех федеральных округах. Инфицированность крупного рогатого скота лептоспираторами за период с 1963 года по настоящее время представлена в табл. 4. Инфицированность в период 1963–1972 гг. составляла 15,1%, и на первый взгляд нет существенного изменения в снижении инфицированности лептоспираторами крупного рогатого скота, однако следует обратить внимание, что в период до 1976 г. диагностический титр у крупного рогатого скота составлял 1:500, и только в 1976 г. с введением новых Правил по борьбе с лептоспирозом животных диагностическим был признан титр 1:50 для невакцинированного и 1:100 для вакцинированного поголовья животных всех видов. То есть в период до 1976 г. инфицированность крупного рогатого скота фактически была выше в 4–5 раз, и было соответственно не выявлено существенное количество инфицированных животных, которые не имели клинических признаков болезни и которых развозили по всей стране.

На втором этапе наших исследований (1990–1999 гг.) инфицированность крупного рогатого скота в РФ составляла 17,8%, а в период 2007–2016 гг. — 10,1%. В этой связи можно говорить о том, что количество инфицированного крупного рогатого скота в РФ неуклонно снижается, хотя показатели инфицированности по разным регионам имеют существенные колебания от средних данных по стране.

Более подробно процесс снижения инфицированности у крупного рогатого скота по годам за последние двадцать лет представлен в табл. 5.

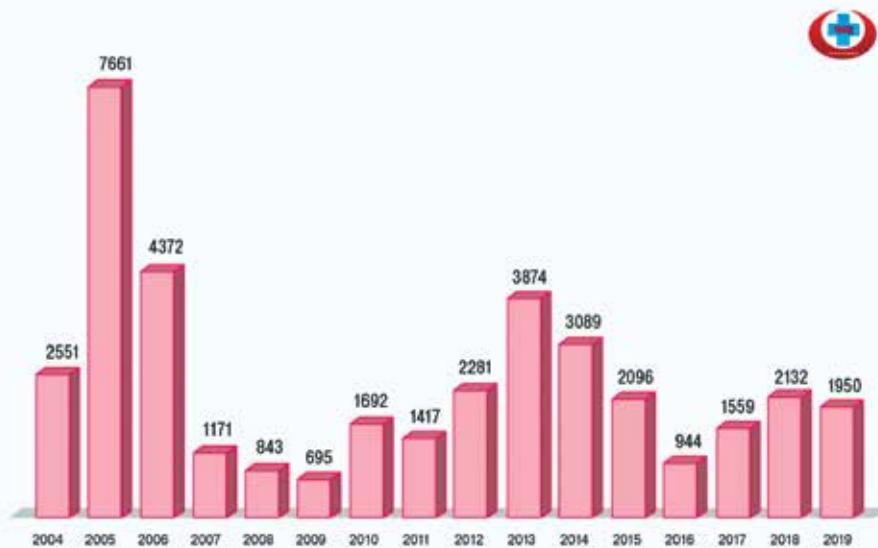
Таким образом, за последние 20 лет исследовано более 12 млн голов крупного рогатого скота. За этот период инфицированность снизилась с 25,1% до 6–7%, т.е. практически в 3–4 раза по сравнению с исходным периодом, что является весьма существенным.

Динамика заболеваемости крупного рогатого скота за последние годы представлена на рис. 11, 12, опубликованных на сайте Россельхознадзора, из которых видно, что заболеваемость носит волнобный характер, с колебаниями за последние десять лет от 695 (2009 г.) до 3874 случаев (2013 г.). В 2019 г. заболеваемость у крупного рогатого скота составляла 1950 случаев. Судя по всему, данные цифры представлены из расчета на 100 тыс. животных данного вида. Исходя из этого, заболеваемость лептоспирозом крупного рогатого скота в РФ за последние 10 лет составляет менее 5%.

Таблица 5. Динамика снижения инфицированности крупного рогатого скота в РФ по годам

Год	Кол-во исследованных животных	Инфицированность (+PMA, %)
1996	626 814	25,1
1997	610 848	24,8
1998	626 495	24,4
1999	618 891	24,6
2000	613 778	24,7
2001	652 057	23,4
2002	484 243	20,6
2003	562 777	18,9
2004	536 844	18,6
2005	528 636	19,9
2006	591 867	19,1
2007	450 089	17,4
2008	588 989	15,8
2009	651 105	13,0
2010	655 797	10,5
2011	679 286	9,4
2012	911 890	7,1
2014	705 650	7,5
2015	505 247	6,4
2016	535 711	6,3
<b>Итого</b>	<b>12 137 014</b>	<b>25,1% ↘ 6,3%</b>

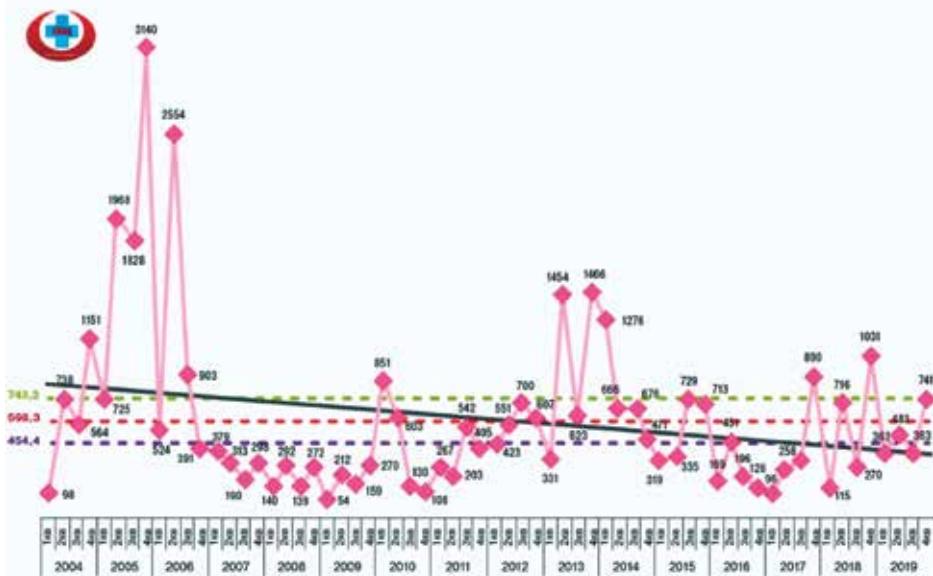
Годовая динамика заболеваемости по лептоспирозу КРС (2004 - 2019 гг.)



Информационно-аналитический центр Россельхознадзора

Рис. 11

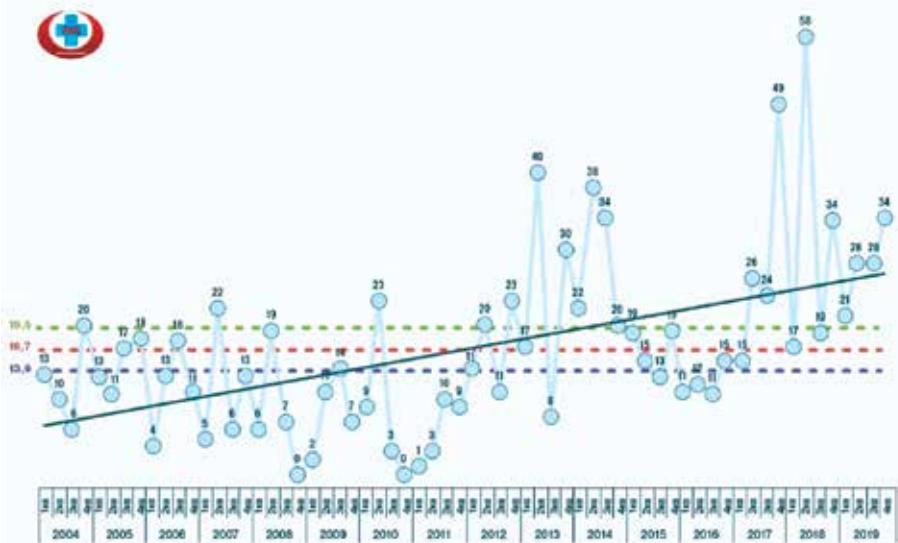
**Ежеквартальная динамика заболеваемости по лептоспирозу КРС  
за 2004 - 2019 гг.,  $M \pm 2m = 598,8 \pm 144,4$  (от 454,4 до 743,2)**



Информационно-аналитический центр Россельхознадзора

Рис. 12

**Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов  
по лептоспирозу КРС за 2004 - 2019 гг.,  $M \pm 2m = 16,7 \pm 2,8$  (от 13,9 до 19,5)**



Информационно-аналитический центр Россельхознадзора

Рис. 13



Рис. 14

Кроме того, следует обратить внимание, что при неуклонном снижении количества инфицированных животных и достаточно низкой заболеваемости лептоспирозом крупного рогатого скота (наличие клинических признаков), отмечается рост количества первичных неблагополучных пунктов, что также представлено на сайте Россельхознадзора (*рис. 13*).

Данные вопросы требуют тщательного анализа эпизоотической ситуации, поиска источников возбудителя инфекции, наличия данных о соблюдении сроков проведения вакцинации и ревакцинации,полноте охвата поголовья вакцинацией, правильной трактовки положительных реакций, установлении и ликвидации лептоспироносительства, проведения дезинфекционных и дератизационных мероприятий, а также возможного роста хозяйств с мелкотоварным производством.

Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные, в том числе бессимптомно, которые выделяют лептоспирзы главным образом с мочой (лептоспироноситель). В случае инфицирования крупного рогатого скота лептоспирозами серовара *hardjo* лептоспирзы выделяются и с мочой, и с истечениями из половых органов. С молоком лептоспирзы выделяются только при клинически выраженным течении лептоспироза, а со спермой — при контаминации ее в мочеполовых путях. Лептоспироносительство продолжается у крупного рогатого скота до 3 лет. При этом следует отметить, что вакцинированные животные, если они не подвергались стерилизации (обработке стрептомицином), тоже могут быть лептоспироносителями.

По данным Jarlath Nally [85], в США носительство лептоспир серогруппы *Sejroe* у крупного рогатого скота может быть на уровне 7% (*рис. 14*). По мнению

автора, между серологическими находками и выделением лептоспир с мочой имеется слабая коррелятивная связь. Крупный рогатый скот является источником и резервуаром возбудителя инфекции. К сожалению, автор не указывает серовар лептоспир серогруппы *Sejroe*.

Факторами передачи при лептоспирозе являются вода, корма, пастища, почва, подстилка и т.д., контаминированные лептоспираторами. Наиболее же благоприятной средой для сохранения лептоспир вне организма являются невысохшие лужи, пруды, болота, медленно текущие речки, влажная почва с реакцией среды, близкой к нейтральной. Тёплая вода стоячих водоёмов или медленно текущая вода благоприятна для сохранения лептоспир в окружающей среде, и это основные факторы передачи возбудителя при лептоспирозе животных и человека [30, 82, 104]. Названные факторы передачи возбудителя инфекции могут быть неактуальны при стойловом содержании животных на крупных промышленных комплексах, однако комбикорма, сено, подстилка могут быть контаминированы мочой грызунов и животных-лептоспироносителей на заготовительных пунктах, складах, хранилищах и т.д., что проконтролировать практически невозможно (рис. 15, 16). Но факт появления антител у бесконтактных животных мо-

жет свидетельствовать об этом. Постоянная дезинфекция и дератизация всегда являются актуальными.

Следует отметить, что для лептоспироза характерна стационарность. При этом неблагополучие по этому заболеванию может поддерживаться десятилетиями. Это обусловлено следующими факторами:

- неправильным или недостаточно эффективным проведением ветеринарно-санитарных мероприятий (дезинфекция, дератизация, контроль водоемов);
- несоблюдением сроков и объемов вакцинации;
- вакцинацией по тем или иным причинам только части животных, например только животных, имеющих антитела;
- бесконтрольными перемещениями и перевозками животных;
- формированием поголовья без исследования на лептоспироз;
- неправильным пониманием инфекционного и эпизоотического процессов при лептоспирозе и т.д.;
- расположением хозяйства (фермы) в зоне природного, антропургического или смешанного очага лептоспироза.

Практически эти же причины обуславливают и появление первичных неблагополучных пунктов, показанных на рис. 13.



Рис. 15, 16

Лептоспироз крупного рогатого скота может быть отнесен к числу болезней с выраженной сезонностью при пастбищном содержании животных и доступе к воде открытых водоемов. При стойловом содержании животных сезонность может отсутствовать, и болезнь будет проявляться с равной интенсивностью на протяжении всего года.

Достаточно интересным является рис. 17, сделанный португальскими авторами, которые делают акцент на том, что лептоспирсы серовара *hardjo* серогруппы *Sejroe*, являясь основным резервуаром и источником возбудителя инфекции у крупного рогатого скота, передаются не только от одной особи к другой, но и через случайных хозяев, в качестве которых может выступать мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, собаки, дикие животные и грызуны [93].

В целом механизм передачи возбудителя инфекции при лептоспирозе включает известную триаду Громашевского Л.В.: выход возбудителя во внешнюю среду, пребывание его во внешней среде и проникновение возбудителя в организм здорового животного (рис. 18).

Для лептоспироза характерным является политропизм путей заражения и монотропизм путей выделения возбудителя. Исключение составляют у крупного рогатого скота лептоспирсы серовара *hardjo* серогруппы *Sejroe*, которые заселяют весь мочеполовой тракт и выделяются не только с мочой, но и с истечениями из половых органов.

В случае если инфекция передается посредством прямого контакта с мочой инфицированных животных, половым путем, трансплацентарно, при хищничестве, то второе звено может отсутствовать.

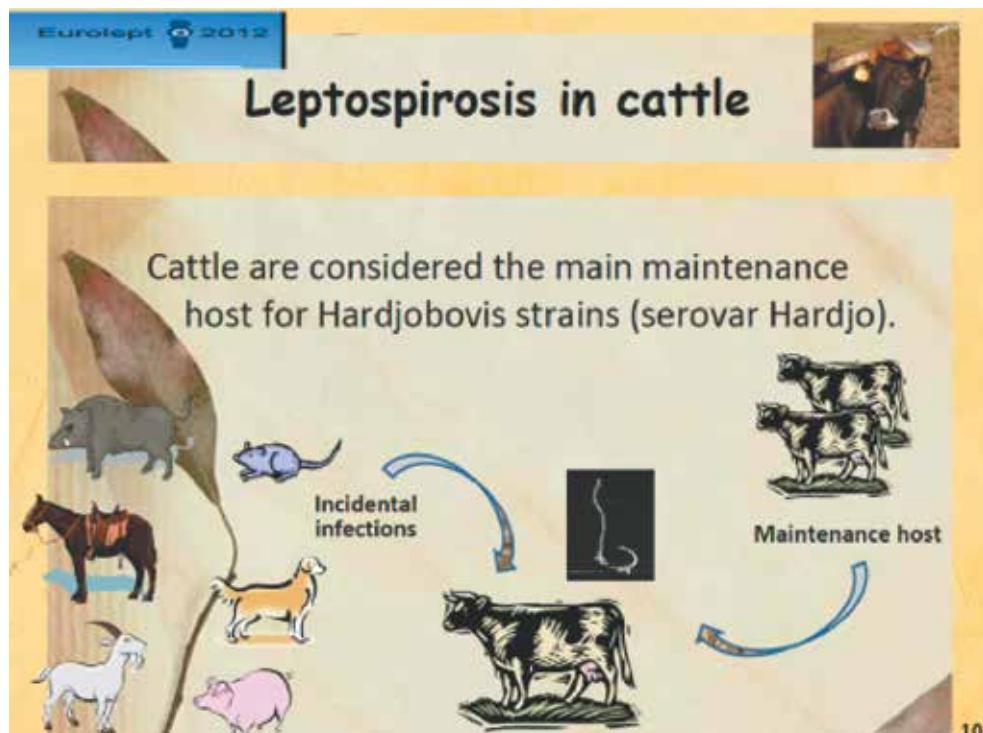


Рис. 17



## Механизм передачи возбудителя инфекции при лептоспирозе

### Выход возбудителя во внешнюю среду

(монотропизм путей выделения возбудителя, основной источник возбудителя инфекции – вполне здоровые животные-лептоспироносители)

### Пребывание во внешней среде

- для сероваров *hardjo* (*Sejroe*), *bratislava*, *munchen* (*Australis*) - лептоспироз можно рассматривать как венерическую инфекцию (проведение искусственного осеменения, получение спермы только от здоровых животных)
- внутриутробное заражение      ● хищничество (для плотоядных)
- попадание мочи на слизистые или кожу здоровой особи

### Проникновение в организм здоровой особи

(политропизм в отношении ворот инфекции)

- в данных случаях пребывание возбудителя во внешней среде может отсутствовать

Рис. 18

Сроки выживания лептоспир в воде, почве, органах и тканях, в пищевых продуктах, в моче представлены достаточно подробно [30, 86, 104].

Основной путь передачи инфекции — водный, меньшее значение имеют контактный и пищевой. В этой связи лептоспироз наиболее часто регистрируется у человека, как уже отмечалось, в странах или регионах с тропическим или субтропическим климатом, где периодически возникают вспышки, охватывающие сотни и даже тысячи людей [100]. Вероятность внезапного осложнения эпидемиологической обстановки многократно возрастает в условиях чрезвычайных ситуаций (наводнения, землетрясения и пр.). Одна из крупнейших за последние годы вспышек (2158 случаев заболеваний, в их числе 167 летальных) произошла на Филиппинах (Манила) вскоре после двух мощных тайфунов и

последующего наводнения в сентябре-октябре 2009 г. [6].

Сообщается, что чаще всего от заболевания страдают рабочие на фермах крупного рогатого скота и лица, занятые на плантациях сахарного тростника.

В организм человека или животного лептоспирры, обладая активной подвижностью и, кроме того, инвазивно-



Рис. 19



Рис. 20

стью, проникают через незначительные повреждения кожи и неповрежденные слизистые оболочки полости рта, носа, глаз, желудочно-кишечного и мочеполового трактов (политропизм в отношении ворот инфекции) (*рис. 19, 20*).

Нередко спорадические случаи или групповые вспышки лептоспирозов возникают при проведении состязаний, связанных с водными видами спорта. Примером может служить «международная» вспышка в Малайзии (о. Борнео) в 2000 г.,

когда тяжелой формой лептоспироза заболели атлеты из 27 стран мира, принявшие участие в многоборье, включавшем греблю на каноэ. Рис. 21 любезно предоставлен членом-корреспондентом РАН Ананьиной Ю.В. [3, 6, 97].

Кроме того, для лептоспироза характерны и купальные вспышки (*рис. 22, 23*), где источником возбудителя инфекции могут быть грызуны, собаки, крупный рогатый скот.

Источником возбудителя инфекции для человека являются инфицированные крысы, мышевидные грызуны, насекомоядные, собаки, сельскохозяйственные животные. На рис. 24 мы видим, что инфицированные сельскохозяйственные животные потенциально могут быть источником возбудителя инфекции для человека, однако в резолюции 10 Всероссийской конференции по лептоспирозу (2003) записано, что в настоящее время сельскохозяйственные животные не играют существенной роли в качест-



Рис. 21



Рис. 22



Рис. 23

ве источника возбудителя инфекции на территории РФ.

На рис. 25 и 26 приведена практически аналогичная схема инфицирования человека, представленная французскими [60] и новозеландскими [83] исследователями, когда источником возбудителя инфекции чаще всего являются разные

виды грызунов и сельскохозяйственные животные, а основными факторами передачи — инфицированные мочой лептоспироносителей водоемы и почва. На рисунке также обозначен обмен возбудителями и, в конечном счете, инфицирование человека, который является биологическим тупиком для возбудителя



Возможен профессиональный характер заражения, при этом выделяют:  
сельскохозяйственный, промысловый, производственный, лабораторный типы заболеваемости.

Рис. 24

## Схема инфицирования человека и животных (Andre Fontaine G., France, 2010)



Рис. 25

инфекции. Кроме того, следует обратить внимание, что в качестве источника возбудителя инфекции для человека нигде

не отмечены кошки, а этот вопрос достаточно часто поднимается и в литературе, и на разных форумах.

## Схема инфицирования человека и животных (Fang Fang, New Zeland, 2014)

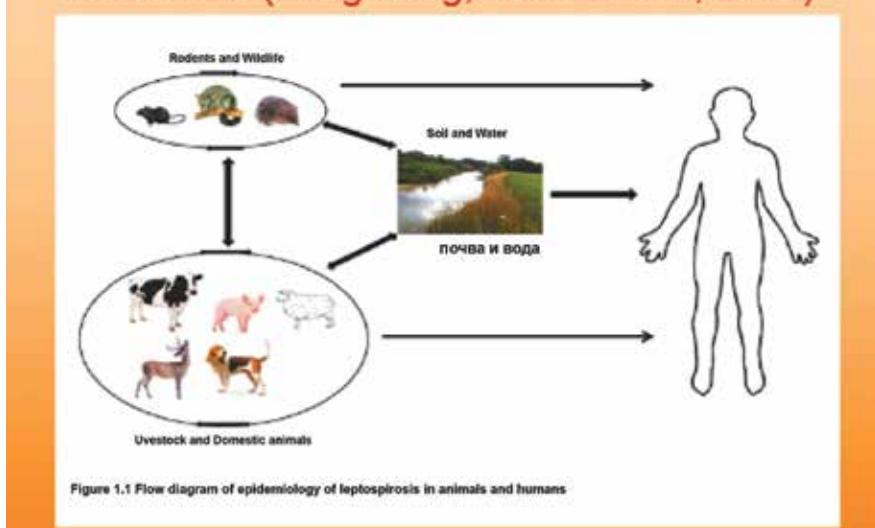


Рис. 26



## Эпидемиологическая ситуация по зоонозным заболеваниям

Заболевание / год	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Лептоспироз	848	609	616	405	366	260	251	249	250	127	165	165	139	169
Бруцеллез (пернициоз)	420	296	410	409	431	466	465	342	369	363	331	317	290	397
Трихинеллез	206	н.д.	328	153	206	84	118	30	94	38	137	62	42	51
Туляремия	67	108	95	27	115	53	127	1063	98	71	123	170	71	41
Сибирская язва	6	3	24	1	22	4	12	2	7	3	36	0	3	6
Бешенство	4	8	17	12	16	13	4	6	3	6	5	2	2	2
Орнитоз (птичий грипп)	н.д.	62	51	104	48	61	106	37	29	13	22	14	4	2
Столбняк	н.д.	15	11	10	13	8	21	11	8	13	18	13	11	13
Туберкулез (пернициоз)	162097	113552	120021	116816	108524	103817	96740	80915	86006	83845	77852	70532	64258	60313
Кантилобактериоз	н.д.	395	485	515	803	1153	1446	1731	1740	2285	2358	2630	2901	3866
Тенниоз	н.д.	н.д.	102	93	96	70	57	42	44	55	38	37	40	35
Тенициареноз	н.д.	н.д.	346	246	225	137	142	162	68	80	64	67	42	40
Эхинококкоэз	н.д.	н.д.	551	540	567	538	280	477	475	437	413	455	480	451

Сведения о заболеваемости людей представляются на основании данных, поступающих из Роспотребнадзора.  
Приведены количественные показатели заболеваемости людей по годам наблюдения.

### Информационно-аналитический центр Россельхознадзора

Рис. 27

Заболеваемость людей в Российской Федерации представлена на сайте Россельхознадзора и рис. 27, из которого видно, что число заболеваний человека лептоспирозом с 2006 по 2019 гг. неуклонно снижалось и на конец периода составляло 169 случаев.

В современный период в большинстве регионов России отмечается устойчивая тенденция к урбанизации некоторых зоонозов: на долю городского населения приходится до 70–80% от числа зарегистрированных больных туляремией, лептоспирозами, иксодовыми клещевыми боррелиозами [4]. Прогрессирующее возрастание доли городского населения в общей структуре заболеваемости (рис. 28) обусловлено ростом типично «городских» этиологических форм лептоспирозов (*Icterohaemorrhagiae* и *Canicola*), источником и резервуаром которых являются соответственно крысы и собаки [51, 52, 58].

Таким образом, с учётом того, что лептоспироз является зоонозом с широким распространением, внимание специалистов разного профиля должно быть сосредоточено на изучении эпизоотической и эпидемической ситуации в масштабах каждого региона, проведении мониторинга в природных очагах, установлении их границ, изучении изменений в популяциях грызунов и изучении этиологической структуры лептоспироза каждого вида животных, в том числе в антропургических очагах [90].

**Патогенез.** Лептоспирры различных сероваров в организме здорового животного вызывают развитие инфекционного процесса, который у животных разных видов характеризуется общими чертами [30], такими как:

- общие ворота возбудителя инфекции,
- отсутствие поражений на месте проникновения возбудителя инфекции и в регионарных лимфатических узлах,



Рис. 28

- кратковременная лихорадка,
- длительное персистирование в мочеполовых органах,
- выделение возбудителя с мочой,
- поражения в почках типа нефрита и дегенераций,
- непостоянно — гематурия и желтушность.

При экспериментальном или естественном инфицировании (рис. 29), лептоспирсы не вызывают поражений на месте внедрения и в регионарных лимфатических узлах и благодаря активной подвижности быстро попадают в кровяное русло, где их количество постоянно на протяжении периода бактериемии увеличивается. Продолжительность этого периода, по данным разных авторов, у крупного рогатого скота колеблется от 2 до 10 дней. Из кровяного русла лептоспирсы проникают в паренхиматозные органы, в т.ч. печень, почки, селезенку, а также матку, развивающийся плод, спинномозговую жидкость, глаза. После активного раз-

множения в крови и паренхиматозных органах лептоспирсы вновь поступают в кровяное русло. У части животных процесс размножения и накопления лептоспир в крови сопровождается лихорадкой, как правило, кратковременной, и её не всегда выявляют. Появление пирогенного эффекта возможно отследить только при экспериментальном заражении, причем далеко не всегда, т.к. это связано с адаптацией лептоспир определенного серовара к животному данного вида, вирулентностью штамма, способом инфицирования и т.д. При естественном заражении пирогенный эффект, как правило, у большинства животных не проявляется по тем же причинам и из-за небольшого количества лептоспир, проникающих в организм.

Характер инфекционного процесса даже в популяции животных одного вида может варьировать от бессимптомной инфекции до тяжелой болезни с летальным исходом. Как правило,



Рис. 29

между лептоспираами и их хозяевами устанавливается биологическое равновесие, при котором не наблюдается видимого болезнестороннего влияния паразита на организм хозяина.

Процесс бактериемии сопровождается образованием специфических антител, которые традиционными методами исследования выявляются на 5–7-й день после инфицирования.

Под действием антител происходит разрушение лептоспир и высвобождение эндотоксинов, которые играют ведущую роль в патогенезе болезни, приводят к разрушению эритроцитов, анемии и накоплению большого количества гемоглобина, который поступает в печень, где из него образуется билирубин. В неизмененной печени билирубин связывается с глюкуроновой кислотой и выводится в желчный пузырь.

При поражении печени процесс выведения билирубина нарушается, он адсорбируется из крови тканями, окрашивая их в желтый цвет, и, как следствие, возникает желтуха.

Эндотоксин оказывает действие и на стенки сосудов, которые становятся хрупкими, их проницаемость повышается. В результате этого возникают кровоизлияния в почках (в моче появляется кровь — гематурия), легких, эндокарде, эпикарде, на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта, в кожных покровах и конъюнктиве глаз. Кроме того, происходит сужение капилляров, закупорка их тромбами, что приводит к нарушению питания кожи и слизистых оболочек, и, как следствие, возникают некрозы кожи.

С накоплением антител лептоспирзы исчезают из кровяного русла и далее из паренхиматозных органов, однако у ча-



**Локализация лептоспир в  
мочеполовых путях коров и нетелей  
(ELLIS, 1992)**

Группа животных	Всего	Лептоспир выделены из					Всего выявлено инфицированных животных	Серогруппа, серовар выделенных изолятов
		влагалища	матки	яйцеводов	яичников	почек или мочи		
Нетели	30	8	11	18	1	19 (63%)	20 (67%)	<i>Sejroe hardjo</i>
		19 (63%)						
Коровы	30	5	11	12	2	18 (60%)	19 (63%)	<i>Sejroe hardjo</i>
		15 (50%)						
ВСЕГО	60	13	22	30	3	37 (62%)	39 (65%)	<i>Sejroe hardjo</i>
		34 (57%)						

**Серологическая диагностика:**

- 1:100 и > - 26% инфицированных животных,
- 1:10 - 1:30 - 21,5% (остаётся неучтённой),
- < 1:10 - 52% (остаётся неучтённой).

Рис. 30

сти животных они остаются в извитых канальцах коркового слоя почек, где действию антител они недоступны, продолжают свободно размножаться и выделяются во внешнюю среду с мочой. Характерной особенностью лептоспироза и общим для животных различных видов является формирование хронического лептоспироносительства [30].

Кроме того, у крупного рогатого скота лептоспироз серогруппы *Sejroe* серовара *hardjo* способны заселять не только корковый слой почек, но и весь мочеполовой тракт (рис. 30). Местом локализации лептоспир у коров и нетелей являются влагалище, матка, яйцеводы, яичники. Причем процент обнаружения и выделения лептоспир из почек и/или мочи практически такой же, как и из полового тракта, и составляет у нетелей (и в том и в другом случае) 63%, у коров соответственно 60% и 50%. Та-

ким образом, лептоспирсы серогруппы *Sejroe* серовара *hardjo* постоянно персистируют в генитальном тракте крупного рогатого скота, способны проникать через плацентарный барьер и вызывать abortionы и мертворождения. Кроме того, они обуславливают половой путь передачи инфекции, а наличие в матке, яичниках и яйцеводах объясняет их роль в патологии бесплодия [80].

Исходя из этого, лептоспироз у крупного рогатого скота, вызываемый лептоспирами серовара *hardjo* серогруппы *Sejroe*, можно рассматривать как венерическую инфекцию, избежать которой можно, кроме проведения диагностических и общих ветеринарно-санитарных мероприятий, проведением искусственного осеменения и получением спермы только от неинфицированных животных. Также следует обратить внимание, что при серологической диаг-

ностике поголовья крупного рогатого скота в диагностическом титре 1:100 и более дают положительную РМА 26% животных. Большая часть поголовья животных, являясь инфицированной, в 21,5% имеет титр антител в РМА 1:10–1:30 и в 52% случаев — менее чем 1:10 и, соответственно, остается неучтеною, что необходимо предусмотреть при проведении противоэпизоотических мероприятий. Таким образом, по результатам серологического исследования с учетом диагностического титра антител выявлен меньший процент инфицированных животных, чем по результатам бактериологического.

Дискутируется вопрос о том, что низкие титры антител являются свидетельством эндемичности инфекции *hardjo*. У инфицированных сероваром *hardjo* стельных коров.abort возможен после пика серологической реакции, и в данном случае пробы парных сывороток не играют никакой роли в диагностике aborta leptospiroznoy этиологии, т.к. при повторном иссле-

довании abortировавшей коровы через 7–10 дней отмечают либо снижение титра антител, либо он остается на прежнем уровне. Кроме того, в данном случае результаты бактериологического исследования материала от abort-ploda в большинстве случаев оказываются отрицательными, т.е. интервал между гибелю плода и его изгнанием из организма больше, чем период выживания лептоспир в погибшем плоде, и в данном случае помочь в диагностике leptospiroza может оказаться использование ПЦР-анализа.

В этой связи следует уделить внимание наличию антител в сыворотке крови abortированного плода или мертворожденного теленка, что является неопровергаемым доказательством внутриутробного инфицирования лептоспирами. С появлением антител в сыворотке крови плода лептоспирзы заражают почки плода, и внешне нормальные новорожденные телята являются уже leptospiroносителями и источником возбудителя инфекции для других



Связь между типом плаценты и передачей иммуноглобулинов						
Вид животного	Тип плаценты	Число слоев плаценты		передача Ig (%)		
		материнской	плодной	пренатальный период	постнатальный период	
Лошадь Осел Свинья	эпителиохориальный	3	3	0	100	
Корова Овца Коза	синдесмохориальный	2	3	0	100	
Собака Кошка Лиса	эндотелиохориальный	1	3	5-10	90-95	
Человек Обезьяна	гомохориальный	0	3	100	0	
Кролик Морская свинка	гомэндотелиальный	0	1	100	0	

Рис. 31

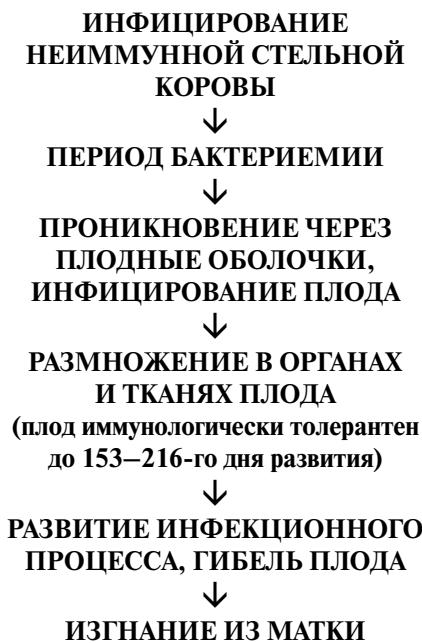
животных и человека. Таким образом поддерживается эндемичное неблагополучие хозяйства по лептоспирозу.

У беременных животных лептоспироз является причиной абортов, рождения мертвого или нежизнеспособного плода.

АбORTы и преждевременные роды лептоспирозной этиологии имеют место у животных с эпителиохориальной плацентой — свиньей, жвачных, лошадей. Структура такой плаценты не позволяет антителам проникнуть к плоду, оставляя его беззащитным от внутриутробного заражения (*рис. 31*).

При этом плод становится наиболее уязвимым во второй половине стельности, до того как его иммунологическая система начинает отвечать образованием антител. Гибель плода одни авторы объясняют размножением в нём лептоспир и развитием острого инфекционного процесса, другие — тяжёлой интоксикацией, третьи — некрозами котиледонов.

*Патогенез аборта может быть представлен в виде следующей схемы.*



По данным разных авторов, интервал между клиническими признаками болезни и абортом составляет 1–4 недели (Hanson, 1980), 6–30 дней (Mazonelli, 1984), 2–5 недель (Fennestad, 1958), 1–2 мес. (Faine, 1982), 6–12 недель (Hoade, 1972; Dixon, 1983). Таким образом, изгнание плода из матки происходит в срок от 1 до 12 недель, что имеет важное значение при диагностике аборта.

## Клинические признаки

Мы неоднократно говорили о том, что практически до середины прошлого столетия лептоспироз рассматривался как остро протекающая инфекционная болезнь многих видов домашних и диких животных, что нашло отражение во многих монографиях и инструктивных материалах, соответственно этому предлагались и меры борьбы. За многие годы изучения лептоспир и лептоспироза накоплен огромный материал о возбудителях, патогенезе, течении лептоспироза и, соответственно, диагностических и профилактических мероприятиях [30]. Накопленные материалы позволили сформировать взгляд о бессимптомном течении лептоспироза у большинства инфицированного поголовья крупного рогатого скота.

При попадании возбудителя инфекции в невакцинированное стадо наиболее тяжелые вспышки вызывали лептоспирозы серогрупп *Potona*, *Grippotyphosa*, *Canicola*. Лептоспирозы серогруппы *Icterohaemorrhagiae* вызывали спорадические случаи, часто с летальным исходом, и не вызывали эпизоотического процесса. Лептоспирозы *Tarassovi* вызывали бессимптомное переболевание. В последующем отмечена широкая инфицированность крупного рогатого скота лептоспирозами серогрупп *Hebdomadis* и *Sejroe (hardjo)* по всему миру, установлена их роль в патологии

воспроизведения. Выделено большое число изолятов лептоспир из почек и мочи лептоспироносителей, беременной и небеременной матки, яйцеводов, яичников, влагалища, из молока при мастите. Появилось обоснование точки зрения, что крупный рогатый скот — основной хозяин лептоспир серовара *hardjo*. Подтверждено, что каждая положительная РМА является результатом инфицирования животного и свидетельствует о возможном носительстве.

Установленные тенденции развития лептоспироза у крупного рогатого скота в этот период актуальны и в настоящее время, на них основаны все мероприятия по борьбе с лептоспирозом. По меткому замечанию Ellis [81], в настоящее время количество работ по лептоспирозу увеличилось вдвое по сравнению с предыдущими периодами, однако все они не оригинальны.

Нами проведен анализ и обобщены данные по клиническим проявлениям лептоспироза крупного рогатого скота в современных условиях, которые представлены на рис. 32 [30, 59, 60, 64, 65, 66, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79].

У крупного рогатого скота разных возрастных групп, как правило, бессимптомное течение болезни, которое остается незамеченным. У взрослых животных в отдельных случаях, особенно в стрессовых ситуациях, возможны незначительный кратковременный подъем температуры, легкое угнетение, иногда незначительная желтушность и окрашивание мочи в бледно-розовый цвет. Все симптомы исчезают через несколько дней, и животные выздоравливают. В ряде случаев при инфицировании крупного рогатого скота лептоспиралами серогрупп *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhaga-*



**Основные симптомы проявления лептоспироза у крупного рогатого скота**

У БОЛЬШИНСТВА ЖИВОТНЫХ – БЕССИМПТОМНО		
СТЕЛЬНЫЕ КОРОВЫ	ЛАКТИРУЮЩИЕ КОРОВЫ	ТЕЛЯТА
АбORTы	Маститы	Анемия
Мертворождения	Метриты,	Гемоглобинурия ( <i>Pomona</i> )
Рождение слабых телят	Снижение молочной продуктивности	
	Проходы, бесплодие	

Рис. 32

*giae*, *Autumnalis* отмечают некротический дерматит [76, 78, 79].

У коров, инфицированных лептоспиралами серовара *hardjo*, в период лактации возможны маститы, метриты, снижение молочной продуктивности, так называемый «синдром три М». В случае, если данные клинические признаки имеют отношение к лептоспирозу, то они имеют ряд характерных особенностей, а именно поражение всех четырех долей вымени, атрофия вымени без опухания и болезненности, внезапное снижение удоя, появление мутного, желтого и вязкого молока. Молоко часто не содержит типичных возбудителей мастита. Восстановление молочной продуктивности происходит в течение 2 недель. В стадах, эндемичных по *hardjo*-инфекции, практически не отмечается снижение надоев молока за полный период лактации. В дальнейшем у животных возможны проходости и бесплодие.

Отмечают, что тяжелые случаи мастита и агалактии возникают, когда инфекция в хозяйстве появляется впервые [59], но маститы лептоспирозной этиологии могут поражать от 1 до 50% поголовья и вызывать снижение удоев до 30%.

Клинические признаки болезни чаще развиваются у молодняка. При остром течении болезни температура поднимается на 1–2,5°C выше нормы и остается на таком уровне до 4–5 дней. Лихорадка сопровождается депрессией, нарушением приема корма, слабостью, конъюнктивитом, анемией и довольно часто диареей.

В более тяжелых случаях развивается гемоглобинурия (первый заметный симптом) вследствие гемолитической анемии. Цвет мочи от бледно-розового до темно-красного и бурого. Появляется желтушность слизистых оболочек, кожи, подкожной клетчатки. Длительность течения — 3–10 дней, летальность — до 50% [76].

Были сообщения о вспышке лептоспироза в трех хозяйствах Кыргызстана [53], где заболело более 100 голов крупного рогатого скота, вынужденно забиты 30% поголовья. У 27% животных болезнь характеризовалась острым течением и сопровождалась иктеро- и гемоглобинурией с синдромом потери молочной продуктивности, у 4% — маститами и у 2% — обширными гнойно-некротическими поражениями кожи. Остальные животные переболели бессимптомно. Наличие лептоспир в моче установлено в 36% случаев, в молоке — в 33% случаев. Исследование сыворотки крови коров и телок показало наличие антител к лептоспиралам серогрупп *Hebdomadis* и *Sejroe* соответственно в 19 и 25% случаев. Авторами выделены 3 штамма лептоспир, 2 из которых отнесены к серогруппе *Hebdomadis* и 1 — к серогруппе *Sejroe*.

Бессимптомное течение болезни у крупного рогатого скота или с проявлением у незначительной части животных тех или иных клинических признаков в 1–7% случаев заканчивается лептоспироносительством, которое в южных регионах составляет 10–50% и более.

Признаки нефрита отмечают как при остром, так и хроническом течении болезни. Уменьшается удельный вес мочи, часто по цвету она не отличается от чистой воды, постоянно содержит лейкоциты.

У стельных животных лептоспироз проявляется в виде абортов во второй половине стельности, мертворождений или рождении слабых телят, если инфицирование произошло в период иммунологической зрелости плода [24, 26, 30, 104]. При инфицировании животных лептоспиралами серовара *hardjo* серогруппы *Sejroe*, по данным Ellis [73, 77], абORTы возможны с 4 месяцев стельности.

Иногда абORTы бывают единственным клиническим признаком инфекции. У абортировавших на почве лептоспи-

разной инфекции коров наблюдают нарушение воспроизводительной функции (Sulser et al., 1976), но повторные abortionы редки (Ellis, Michna, 1976). Это объясняется тем, что у переболевших иммунных животных бактериемия не развивается, и таким образом исключена возможность заражения плода [23, 30].

Данные о количестве abortionов лептоспирозной этиологии в хозяйстве весьма противоречивы, что может быть обусловлено типом возбудителя, его вирулентностью, степенью адаптации к организму данного вида животных, эпизоотической ситуацией в хозяйстве, уровнем дифференциальной диагностики и т.д. Неоднократно высказывалось мнение, что лептоспирозы серовара *hardjo* у крупного рогатого скота вызывают abortionы только спорадически, в отличие от abortionальных «штурмов», которые могут возникать из-за заражения данного вида животных лептоспирозами сероваров *romona* или *griffotyphosa* [105].

Однако следует иметь в виду, что, по данным Ellis [74, 75], частота abortionов, вызванных лептоспирозами серовара *hardjo* серогруппы *Sejroe*, может достигать 30% и более, но это бывает редко. Опасность *hardjo*-инфекции заключается в ее стационарности (ранее мы уже делали акцент на титрах антител к серогруппе *Sejroe* в неблагополучном хозяйстве, которые существенно ниже диагностических, количество таких положительных реакций выше 70%) (рис. 30). Обычно на неблагополучной ферме abortируют из года в год 3–6% стельных коров. Количество abortionов увеличивается при вводе:

- в неблагополучное стадо неиммунных животных,
- лептоспироносителя в благополучное стадо.

Есть сообщения, что abortionы могут носить массовый характер при введении лептоспироносителей в благополучное стадо [77].



Рис. 33

Безусловно, нельзя все abortionы у животных отнести за счет leptospiroza и любые клинические проявления болезни должны иметь лабораторное подтверждение [21, 41].

Возможные причины нарушения функции воспроизведения у крупного рогатого скота представлены на рис. 33 и в табл. 6 [95], любезно предоставленными профессором Орлянкиным Б.Г.

Из данных рис. 33 видно, что доля самых разных неинфекционных агентов, влияющих на нарушение функции воспроизводства, составляет 70%, оставшиеся 30% приходятся на долю многочисленной группы вирусов, бактерий и простейших, часть из которых вызывает abortionы и мертворождения в первой половине стельности, а часть — во второй. Доля leptospirof в этом процессе достаточно скромная.

Tornton [101] провел в хозяйстве анализ abortionов инфекционной и паразитарной этиологии, результаты которого приведены в табл. 6.

особое внимание уделялось наличию клинических признаков (лихорадка, abortionы и др.), из поля зрения выпадали животные с бессимптомным течением, leptospiroносители, которых постоянно обнаруживаются как в неблагополучных, так и в благополучных по leptospiroзу фермах. Это подтвердило необходимость использовать при оценке эпизоотической ситуации понятие «инфицированность» [9, 14, 18, 23].

При leptospiroze крупного рогатого скота так же, как и при leptospiroze животных других видов, на протяжении более чем полувека с приведением данных по инфицированности и заболеваемости [24, 26, 30, 47, 48, 49, 50, 52] отмечают, что типичные симптомы болезни проявляются только у незначительной части животных, исчисляемой всего лишь нескользкими сотнями или тысячами голов. Применительно к leptospiroзу свиней, лошадей и собак —ическими десятками или сотнями голов. Также отмечалось, что опасность животных с теми

Таблица 6. Анализ abortionов в хозяйствах (Tornton R., 1996)

Возбудитель	Количество	Процент
NEOSPORA	112	74,7
Грибы	14	9,3
Разные виды бактерий	12	8,0
Leptospira Pomona	6	4,0
Вирус диареи крупного рогатого кота	6	4,0
Итого abortionов	150	100

В данном хозяйстве имели место abortionы, вызываемые leptospiрами субгруппы *Pomona*, доля которых в общей патологии составляла 4%.

Также следует отметить, что любые клинические проявления болезни должны иметь лабораторное подтверждение [21, 41].

С описанием leptospiroza как самостоятельной нозологической единицы

или иными клиническими признаками leptospiroза как источника возбудителя инфекции не столь велика, поскольку их легко выявить, изолировать из общего поголовья и после уточнения диагноза, исходя из хозяйственной целесообразности, определить перечень необходимых противоэпизоотических мероприятий. Данный постулат был сформулирован Ю.А. Малаховым еще в 1978 г. и продол-

Таблица 7. Инфицированность и заболеваемость крупного рогатого скота лептоспирозом

Год	Инфицированность*	Заболеваемость**
2014	52 528	3089
2015	32 534	2096
2016	33 910	944

\* Инфицированность — количество животных/100 тыс., имеющих антитела в крови и/или лептоспир в моче.

\*\* Заболеваемость — количество животных/100 тыс. с клиническими признаками лептоспироза.

жает оставаться актуальным и на современном этапе, что подтверждается изучением эпизоотической ситуации применительно к лептоспирозу животных [13, 44].

В табл. 7 приведены данные по инфицированности и заболеваемости крупного рогатого скота за последние несколько лет.

Количество инфицированного крупного рогатого скота, не имеющего кли-

нических признаков, но имеющего антитела в сыворотке крови и/или лептоспир в моче, как видно из таблицы, в десятки раз превышает количество больных животных, и именно они представляют особую опасность как источник возбудителя инфекции. Выявляют таких животных только лабораторными методами исследования.

Неоднократно отмечалось, что такой дисбаланс между количеством инфици-



Рис. 34

рованных животных\* (подводная часть, выявляемая лабораторными методами диагностики) и животных, имеющих клинические признаки лептоспироза\*\* (надводная часть, выявляемая визуально, с последующим лабораторным подтверждением диагноза) (рис. 34), называют «феноменом айсберга» [24, 26, 30, 47, 49, 50].

Это еще раз подтверждает точку зрения на лептоспироз крупного рогатого скота как на инфекционную болезнь с бессимптомным течением. Аналогичным образом ситуация с лептоспирозом обстоит и у животных других видов.

**Патологоанатомические изменения.** Диагностика лептоспироза является комплексной и включает в т.ч. патологоанатомические исследования.

Патоморфологические изменения в органах и тканях животных связаны с теми или иными клиническими проявлениями лептоспироза, а также с тяжестью течения болезни, её продолжительностью, длительностью лептоспироносительства.

Исследования патоморфологических изменений в органах и тканях при бессимптомном лептоспирозе у крупного рогатого скота показали, что патогномоничные для лептоспироза изменения локализуются в почках и практически не выявляются в других органах, однако патологоанатомическая картина не позволяет диагностировать лептоспироз без дополнительных лабораторных исследований.

Патологоанатомические изменения при лептоспирозе характеризуются зернисто-жировой дистрофией в почках, хроническим интерстициальным нефритом или острым паренхиматозным нефритом.

При зернисто-жировой дистрофии почки были глинисто-желтого цвета с множественными красными инфарктами, имеющими вид красных пятен раз-

личной величины и формы, проникающих на всю глубину коркового слоя. Иногда на поверхности возможны единичные или множественные точечные кровоизлияния.

Хронический интерстициальный нефрит с острым геморрагическим гломерулонефритом характеризовался наличием множественных серо-белых очажков диаметром 1–2 мм, проникающих вглубь коркового слоя. На поверхности почек достаточно часто отмечают точечные кровоизлияния.

При остром паренхиматозном нефrite почка отёчна, с мраморной окраской, сероватые пятна чередуются с участками нормально окрашенной ткани, сосуды инъецированы, как представлено на рис. 35 [62].



Рис. 35

Граница коркового и мозгового слоёв при всех описанных поражениях сглажена, и данные поражения являются патогномоничными для лептоспироза крупного рогатого скота.

В случае аборта лептоспирозной этиологии при патологоанатомическом и гистологическом исследовании в плаценте обнаруживают отёчность, вялость котиледонов, локальную дегенерацию и точечный некроз ворсинок, обширные геморрагии и гемосидероз в местах соединения аллантохориона с материнскими тканями, вакуолизацию или пикноз отдельных клеток хориона, увеличение

фиброзной соединительной ткани в материнских криптах, а также нарушение связи крипты с плодными ворсинками.

Абортованные плоды внешне выглядят нормальными. Степень выраженности патологоанатомических изменений зависит от продолжительности болезни зародыша и времени его нахождения в утробе матери после смерти.

В подкожной клетчатке различных участков тела обнаруживают ограниченные студенистые инфильтраты, в брюшной и грудной полостях — большое количество темно-красной или соломенно-жёлтой жидкости; органы и мышцы плода отёчны с явлениями аутолиза; капсула с почек снимается с трудом, под капсулой обнаруживают серо-белые узелки диаметром до 5 мм, уходящие в глубь паренхимы и иногда достигающие почечной лоханки.

Микроскопически в почках устанавливают инфильтрацию лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов, некрозы и атрофию почечных канальцев и межканальцевых участков, соединительнотканную фиброзную пролиферацию и утолщение боуменовых капсул, интерстициальный нефрит.

Патологические изменения в плаценте и инфицирование плода не всегда сопровождаются его гибеллю. Исход зависит от степени повреждений и физиологического состояния плаценты, дозы и вирулентности лептоспир, способности зрелого плода образовывать антитела.

Антитела не передаются внутриутробно, следовательно, обнаружение их в крови плода связано с выработкой антител иммунной системой самого плода.

Таким образом, ещё раз следует отметить, что описываемые патологоанатомические изменения не являются патогномоничными для лептоспироза крупного рогатого скота, кроме изменений в почках [30, 82], не зависят от серовариантной принадлежности воз-

будителя, способа заражения и возраста животного и требуют подтверждения лабораторными методами диагностики. Обнаружение лептоспир в почках не является свидетельством гибели животного от лептоспироза.

**Диагностика.** Диагностика лептоспироза у людей и животных основывается на совокупности эпизоотологических, эпидемиологических, клинических, патологоанатомических данных с обязательным подтверждением диагноза лабораторными методами исследований [15, 21, 28, 30, 31, 32, 41, 47, 48, 49, 50, 52].

Методы диагностики лептоспироза, принятые в России, соответствуют таковым, принятым Международным эпизоотическим бюро [91, 92].

Не являясь патогномоничными, клинические проявления и патологоанатомические изменения позволяют только заподозрить наличие лептоспирозной инфекции, но не позволяют поставить, подтвердить или исключить диагноз.

Схема постановки диагноза на лептоспироз у сельскохозяйственных животных по клиническим признакам болезни, где каждый показатель оценивается в баллах, с учётом результатов лабораторных исследований, предложена Faine [82] и представлена в табл. 8.

Из таблицы видно, что **любой клинический признак при лептоспирозе характеризуется низкой балльной оценкой (1–2 балла).** Из клинических признаков только аборт и мастит имеют достаточно высокий диагностический статус, но его не достаточно для постановки окончательного диагноза без подтверждения лабораторными методами исследования. Обращает внимание, что однократное исследование сыворотки крови как вакцинированного, так и невакцинированного животного не может служить основанием для постановки диагноза. Это может

Таблица 8. Клиническая диагностика лептоспироза по Faine

№ п/п	Признаки	Оценка в баллах
1	Лихорадка	2
2	Слабость, депрессия	2
3	Конвульсии	1
4	Конъюнктивит	2
5	Анемия	2
6	Геморрагии	2
7	Гемоглобинурия	2
8	Желтуха	5
9	Аборт, мертворождение, желтушность и геморрагии у плода	20
10	Мастит у коров	10
11	У вакцинированных животных высокий титр антител в РМА при однократном исследовании	5
12	Нарастане титра антител у вакцинированных при повторном исследовании	20
13	У не вакцинированных животных высокий титр антител	10
14	Нарастане титра антител у не вакцинированных при повторном исследовании	30

#### Трактовка результатов

Диагноз на лептоспироз маловероятен	20
Диагноз возможен	21–29
Диагноз установлен	30 и выше

только свидетельствовать о наличии контакта организма с источником возбудителя инфекции, но ничего не говорит о времени данного контакта и о статусе животного в настоящее время. Высокий статус имеет нарастание титра антител у вакцинированных и неvakцинированных животных при повторном исследовании. Данная схема клинической диагностики может быть взята за основу при предварительной постановке диагноза. Окончательный диагноз может быть поставлен только после подтверждения лабораторными методами исследования.

Лабораторные методы исследований в диагностике лептоспироза выделяются на первое место по причине преобладания случаев бессимптомного течения болезни [7, 9, 24, 30, 47, 48, 49, 81, 91, 92], сложности дифференциальной диагностики, связанной с инфекционной и неинфекционной

патологией, отсутствия выраженных проявлений инфекции у животных-лептоспироносителей, чувствительности и специфичности методов лабораторной диагностики, которые приняты во всем мире.

Лабораторная диагностика лептоспироза решает вопросы:

- постановки диагноза;
- контроля эффективности проводимых мероприятий;
- снятия ограничений.

Успех лабораторной диагностики зависит от эффективности одновременного использования нескольких методов исследования, например исследования парных проб сыворотки крови в РМА, детекции возбудителя в ПЦР, микроскопии, биопробы, выделения возбудителя и других. Наиболее используемые во всём мире методы диагностики лептоспироза, их преимущества и недостатки представлены на рис. 36.



Рис. 36

Существующие методы лабораторной диагностики делятся на две группы. Методы первой группы основаны на обнаружении антител к лептоспиралам (РМА, ИФА), в то время как методы второй группы позволяют выявить самого возбудителя/ДНК возбудителя — лептоспир, антигены лептоспир или их нуклеиновые кислоты в тканях или биологических жидкостях животных.

**1. Серологическая диагностика.** Несмотря на существующее разнообразие предложенных в разное время серологических реакций (РА, РСК, РП, РДП, РНГА и др.), большая часть их оказалась недостаточно чувствительной и специфичной и не нашла широкого применения в лабораторной диагностике лептоспироза. Практически во всём мире используют только два метода — это реакция микроскопической агглютинации (РМА, за рубежом — MAT, microscopic

agglutination test) и иммуноферментный анализ (ИФА).

Метод РМА является эталонным тестом, или, как его называют, «золотым стандартом», с которым сравнивают другие серологические методы и который используется для обязательной проверки животных перед экспортом или импортом и для обследования животных внутри страны. РМА используется для проверки как целых стад, так и отдельно взятых животных [7, 24, 91, 92]. РМА имеет значительное количество перекрёстных реакций в низких разведениях сыворотки между отдельными сероварами и серогруппами лептоспир, позволяет предварительно установить только серологическую группу предполагаемого возбудителя, но не серовар.

Кроме того, важность своевременного использования РМА обусловлена и разницей в этиологической структуре

лептоспироза животных в России и за рубежом, что напрямую связано с вопросами специфической профилактики лептоспироза животных. Исследование ввозимых животных во время карантина на лептоспироз с лептоспиралами 25 известных серологических групп, а также использование сочетанных методов лабораторной диагностики позволит избежать появления в стране новых, в том числе экзотических, сероваров лептоспир.

Метод ИФА позволяет проводить диагностические исследования на уровне рода *Leptospira*. У каждого из данных методов свои преимущества и свои недостатки. Из материалов, представленных в книге Greene [68], РМА (МАТ) считается более специфичным и чувствительным по сравнению с наборами на основе ИФА, поэтому использование только ИФА не рекомендуется. ИФА-наборы являются скрининговыми для предварительного определения антител с последующим исследованием положительно реагирующих животных в РМА [36].

Лабораторная диагностика лептоспироза в РФ полностью основана на серологических методах исследования — постановке реакции микроагглютинации (РМА), другие методы диагностики используются крайне редко [9, 25, 27, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50]. При выявлении положительных реакций с лептоспиралами той или иной серогруппы диагностические лаборатории дают рекомендации практикующим ветеринарным врачам по обработке поголовья стрептомицином. Следует отметить, что после естественного инфицирования антитела у животных сохраняются неопределенно долгое время, при этом возбудителя инфекции в крови уже нет, у определенного числа особей возбудитель сохраняется в почках, выделяясь с мочой, и в мочеполовом тракте (*hardjo*, см. патогенез). Антибиотики в рекомендованной дозе, применяемые по схеме, санируют почки,

освобождая животных от лептоспироносительства, но не отражаются на титре антител.

Международное эпизоотическое бюро обращает внимание, что для международной торговли принят стандарт, в соответствии с которым за положительный принимают титр антител 1:100, однако, принимая во внимание высокую специфичность РМА (МАТ), более низкие титры могут служить доказательством инфицирования лептоспиралами в прошлом. Кроме того, при постановке диагноза серологическими методами обязательно следует принимать во внимание клиническую картину и серовар, вызвавший заболевание. В случаеabortов у крупного рогатого скота, спровоцированных сероваром *romana*, высокий титр, как правило, наблюдается именно в момент aborta, так как последний чаще всего имеет место вскоре после заражения. Abortы у крупного рогатого скота, причиной которых являются лептоспиралы серовара *hardjo*, носят хронический характер. В этом случае серологические показатели на момент aborta могут варьировать: одни животные будут по итогам тестов серонегативными, а у других будут высокие титры антител. Во время острой фазы лептоспироза, вызванного сероваром *hardjo*, может наблюдаться снижение удоя — данный симптом также коррелирует с высокими титрами антител. При интерпретации результатов РМА необходимо учитывать историю вакцинации, так как повсеместные программы вакцинации приводят к большому числу серопозитивных животных и способны тем самым «маскировать» хронические инфекции в стадах, особенно это характерно для серовара *hardjo* [92].

**2. Методы, основанные на обнаружении возбудителя/ДНК возбудителя** в исследуемом материале: микроскопия в темном поле микроскопа, иммунофлуоресцентный и гистохимический методы, метод

полимеразной цепной реакции (ПЦР), выделение культуры лептоспир, постановка биологической пробы на лабораторных моделях, идентификация и дифференциация выделенных культур. Часть перечисленных методов являются достаточно «новыми и современными», разработанными в последние 20 лет, и, к сожалению, не предусмотрены методами лабораторной диагностики и СП, и ВП (1996), утвержденными более 20–30 лет назад [41].

Выделение лептоспир представляет собой один из наиболее доказательных методов демонстрации их присутствия в крови, органах и тканях организма, однако в РФ, к сожалению, данный метод используется всё реже и реже.

Микроскопия в тёмном поле микроскопа — метод достаточно простой, предусматривает обязательные навыки владения микроскопом и знание дифференциальной диагностики лептоспир от нитей фибрина, обломков хвостовых частей спермииев, разрушенных эритроцитов, спирилло- и вибриоподобных микроорганизмов. Уникальная морфология и своеобразный способ движения лептоспир позволяют безошибочно распознавать их в тестируемом материале, безошибочно дифференцировать их от микроорганизмов других видов, что даёт право при лептоспирозе устанавливать диагноз только на основании микроскопических исследований.

Следует обратить внимание на то, что пробы материала надлежит отбирать до начала антимикробной терапии. Лептоспиреция имеет место в течение первой недели развития инфекции, и число циркулирующих в организме спирохет падает по мере возрастания титров антител в сыворотке крови.

Тест-системы (наборы) для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) все чаще используются для обнаружения лептоспир в тканях (на-

пример abort-ploda) и биологических жидкостях (крови, моче, околоплодных водах, истечениях из мочеполовых путей, сперме и др.) животных ввиду их высокой чувствительности и возможности постановки диагноза на ранних стадиях инфицирования [11, 12, 16, 17, 19, 67], также дифференциации патогенных и свободноживущих лептоспир, в том числе в объектах окружающей среды [20]. Трактовка результатов ПЦР должна проходить по аналогии с обнаружением возбудителя в соответствии с СП 3.1.084-96 и ВП 13.3.4.1100-96, М, 1996 [41].

Тест-система для обнаружения патогенных лептоспир методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) разработана более 20 лет назад в НПО «НАРВАК» Забережным А.Д., Гребенниковой Т.В. при участии сотрудников ВГНКИ [11, 12, 16, 17, 19, 67]. Тест-система используется в ветеринарных лабораториях для выявления ДНК патогенных лептоспир в исследуемом материале (*рис. 37*).

Созданию тест-системы предшествовала кропотливая многолетняя работа по подбору внутренних и внешних праймеров, которые являются универсальными для выявления лептоспир, наиболее значимых в этиологической структуре лептоспироза животных как в России, так и за рубежом. Тест-система показала высокую чувствительность и специфичность.

Talpada M.D. et al. также [99] показали в сравнительном аспекте, что чувствительность и специфичность ПЦР и РМА являются достаточно высокими (*табл. 9*). Эти два метода диагностики не исключают, а наоборот, дополняют друг друга, но выявляют соответственно первый — ДНК возбудителя, второй — антитела в разных фазах болезни, что необходимо учитывать при интерпретации полученных результатов, что отражено на *рис. 38*, любезно предоставленном членом-корреспондентом РАН, профессором Ю.В. Ананьиной.



Тест-система состоит из трех наборов и рассчитана на проведение 50 анализов.

**ВЕТБИОХИМ**

Рис. 37

К сожалению, в практической деятельности ветеринарных лабораторий как «новые» методы диагностики, так и существующие, как уже отмечалось, применяются весьма ограниченно, хотя в хозяйствах, особенно в племенных, встречается достаточно много острых моментов, требующих комплексного подхода к оценке той или иной ситуации с использованием разных методов диагностики.

По результатам лабораторных исследований следует отметить ещё раз общее заблуждение по трактовке положительной реакции микроагглютинации (РМА). **Положительная РМА является**

**свидетельством контакта организма с возбудителем лептоспироза, но не является свидетельством заболевания животного в данный момент [30, 31, 48, 50, 51].** В результате животные, имеющие АТ (без клинических признаков и без контроля на лептоспироносительство), подвергаются ненужному лечению антибиотиками (при этом АТ, естественно, сохраняются), что наносит вред самому животному, но не решает проблему лептоспироза [48, 49, 50, 51, 52]. Кроме того, животных с той или иной клинической картиной,abortами, мертворождениями неизвестной этиологии, не подтвержденной лабораторными мето-

Таблица 9. Сравнительная оценка методов диагностики лептоспироза крупного рогатого скота (Talpada M.D. et al., 2003)

Методы исследования	Материал	Количество проб		% положительных проб
		всего	в т.ч. положительных	
РМА	сыворотка крови	1193	Pom. 262 (22%) Hardio 179 (15%)	36,0
ПЦР	моча	300	106	35,0

## Чувствительность ПЦР-анализа и реакции микроагглютинации лептоспир (РМА) в зависимости от фазы лептоспирозной инфекции

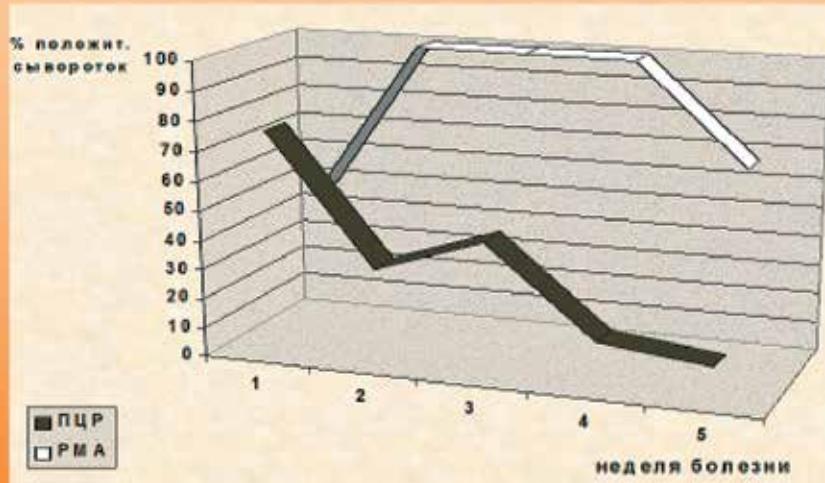


Рис. 38

дами исследования, «лечат» от лептоспироза, но при этом все проделанные манипуляции не дают положительного эффекта.

Термины «больное» и «инфицированное» животное не являются синонимами. Показать статус животного на момент проведения исследований можно с использованием сочетанных традиционных методов диагностики, например РМА и ПЦР, РМА и биопробы и др.

**Специфическая профилактика.** Меры борьбы с лептоспирозом животных как с зоонозом включают комплекс диагностических, общих ветеринарно-санитарных мероприятий, применение средств специфической профилактики и просветительскую работу с населением. Необходимо учитывать особенности биологии лептоспир, возможность и длительность сохранения возбудителя во внешней среде, наличие восприимчивого поголовья животных, возможность

трансграничной передачи, организацию карантинных мероприятий при ввозе, особенно импортируемых животных, знание этиологической структуры лептоспироза в хозяйстве, регионе и стране в целом, возможное наличие природных и антропургических очагов лептоспироза в каждой климатогеографической зоне.

Специфическая профилактика лептоспироза животных, как и в случае с другими инфекционными болезнями, направлена на разрыв эпизоотической цепи, на создание невосприимчивого поголовья с высоким иммунным статусом. Вакцинируют против лептоспироза **всех** восприимчивых животных в следующих случаях:

- в неблагополучных и угрожаемых по лептоспирозу хозяйствах;
- в откормочных хозяйствах, где поголовье комплектуют без обследования на лептоспироз;

- при выпасе животных в зоне природного очага лептоспироза;
- при выявлении в хозяйстве животных, сыворотка крови которых реагирует в РМА.

Поголовная вакцинация в хозяйстве является наиболее экономичной и эффективной мерой борьбы с лептоспирозом. Вакцинация части поголовья не обрывает эпизоотический процесс в хозяйстве, поскольку постоянно остаются неиммунные, восприимчивые к лептоспирозу животные. Кроме того, вакцинации должны подвергаться и животные других видов, расположенные на данной или близлежащей территории, в том числе и сторожевые собаки. Предусмотренные меры борьбы [41] при выполнении в полном объеме обеспечивают сокращение больных и инфицированных животных, что видно из большого объема статистических данных по РФ.

Специфическая профилактика лептоспироза крупного рогатого скота, как и животных других видов, предусматривает использование моно- или ассоциированных вакцин, созданных с учетом этиологической структуры лептоспироза в том или ином регионе мира, как правило, содержащих адьювант (30, 33, 43, 61, 103). В Северной Америке используют вакцины (бактерины), которые включают лептоспирры серогрупп *Sejroe* (*Hardjo*), *Icterohaemorrhagiae*, *Potoma*, *Grippothyphosa* и *Canicola*. В Южной Америке вакцины (бактерины) несколько иного состава и включают лептоспирры серогрупп *Ballum*, *Sejroe* (*Hardjo*), *Potoma*, *Pyrogenes*, *Sejroe* (*Wolffi*), *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae*. *Sejroe* (*Hardjo*) бактерин применяется у крупного рогатого скота в Италии, Нидерландах и в Соединенном Королевстве [60]. Важно помнить о сроках вакцинации и ревакцинации, о необходимости

профилактики абортов, о создании колострального иммунитета и его продолжительности.

О необходимости пассивной защиты молодняка в первые дни и недели жизни иммуноглобулинами молозива вакцинированных против лептоспироза коров неоднократно сообщалось и в отечественной, и в зарубежной литературе [8]. Продолжительность этой пассивной защиты зависит прежде всего от количества иммуноглобулинов, полученных с молозивом [81].

В практических условиях при проведении оздоровительных мероприятий большое значение имеет не только тип вакцин, но и рациональные схемы их применения [8, 54, 84, 89, 102]. А применительно к лептоспирозу вакцина должна быть подобрана для защиты животных конкретного вида в конкретном географическом регионе. В ней должны содержаться лишь те серовары, что угрожают здоровью именно этого вида или передаются животным этого вида в данном регионе [92].

В РФ применяют как отечественные, так и зарубежные вакцины. Следует отметить, что отечественная продукция по качеству не уступает импортным аналогам, состав препаратов отражает этиологическую структуру лептоспироза животных в РФ и сопредельных регионах, которая приведена нами в соответствующем разделе. Следует учитывать не столько серогруппу, сколько серовар лептоспир, циркулирующий в стране, т.к. иммунитет при лептоспирозе формируется на уровне сероваров [63]. Мониторинг этиологической структуры лептоспироза в РФ является приоритетной задачей, как и во многих странах мира.

Перечень вакцин, зарегистрированных в РФ, представлен на сайте Россельхознадзора и в табл. 10.

Таблица 10. Перечень препаратов против лептоспироза КРС, зарегистрированных на территории РФ

Международное непатентованное наименование	Торговое наименование	Производитель	Лекарственная форма; наличие адьюванта	Серогруппы лептоспир, входящие в состав препарата
Вакцина поливалентная «ВГНКИ» против лептоспироза животных	Вакцина поливалентная «ВГНКИ» против лептоспироза животных	ФКП «Армавирская биофабрика»	Суспензия для инъекций (инактивированная вакцина); гель гидрата окиси алюминия в конц. 30%	<i>Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe</i> (серовар <i>hardjo</i> )
Вакцина против лептоспироза животных концентрированная масляная	Вакцина против лептоспироза животных концентрированная масляная	ФКП «Армавирская биофабрика»	Эмульсия для инъекций (инактивированная вакцина); водно-масляная эмульсия в конц. 70%	<i>Pomona, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Sejroe</i> (серовар <i>hardjo</i> )
Вакцина против лептоспироза животных инактивированная	Лептопро	ФКП «Ставропольская биофабрика»	Суспензия для инъекций (инактивированная вакцина); гель гидрата окиси алюминия в конц. 30%	<i>Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe</i> (серовар <i>hardjo</i> )
Вакцина против лептоспироза животных инактивированная лиофилизированная	Лептогард	ФКП «Ставропольская биофабрика»	Лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций; гель гидрата окиси алюминия в конц. 20%	<i>Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe</i> (серовар <i>hardjo</i> )
Вакцина для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и лептоспироза крупного рогатого скота	Бови-шилд Голд FP5 L5	Zoetis Inc., США	Сухой компонент (инактивированная вакцина) — лиофилизированная масса; жидкий компонент (инактивированная вакцина) — суспензия для инъекций	В состав жидкого компонента входят лептоспирсы серогрупп: <i>Canicola, Grippotyphosa, Sejroe</i> (серовар <i>hardjo</i> ), <i>Icterohaemorrhagiae, Pomona</i>
Вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и лептоспироза крупного рогатого скота	Кэтлмастер Голд FP5 L5	Zoetis Inc., США	Сухой компонент (живая вакцина) — лиофилизированная масса; жидкий компонент (инактивированная вакцина) — суспензия для инъекций; Квил А, холестерол и амфиджен	В состав жидкого компонента входят лептоспирсы серогрупп: <i>Canicola, Grippotyphosa, Sejroe</i> (серовар <i>hardjo</i> ), <i>Icterohaemorrhagiae, Pomona</i>

Отечественные вакцины готовят из селекционированных производственных штаммов лептоспир разных сероваров и серологических групп с соблюдением необходимой концентрации микробных клеток в дозе вакцины для животных каждого вида. Хорошие результаты достигаются при использовании средств специфической профилактики лептоспироза согласно утвержденным инструкциям. Необходимо помнить, что иммунный статус животных должен

быть высоким независимо от времени года, это связано с особенностями биологии возбудителя и эпизоотической ситуацией в стране.

Вакцинацию животных проводят для защиты как животных, так и контактирующих с ними людей. Вакцинация является ключевым инструментом при проведении мероприятий по эрадикации лептоспироза. В документах МЭБ отмечают, что вакцины не смогут избавить от инфекции уже зараженное

животное, поэтому вакцинация должна предшествовать инфицированию [92].

На протяжении многих лет неоднократно делался акцент как на наших достижениях (а они, безусловно, есть), так и на недостатках в борьбе с лептоспирозом животных [9, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 46, 47, 48, 49]. Однако практически все они актуальны и по сей день, и эпизоотическая ситуация по лептоспирозу крупного рогатого скота тому подтверждение.

## Литература

1. Ананыин В.В. Природная очаговость лептоспирозов / В.В. Ананыин, Карасева Е.В. М.: Медицина, 1961; 346.
2. Ананьина Ю.В. Природноочаговые бактериальные зоонозы: современные тенденции эпидемического проявления. Журн. микробиол. 2002; 6: 86–90.
3. Ананьина Ю.В. Современные тенденции эпидемического проявления природных и техногенных очагов лептоспирозов // Лептоспироз: материалы Всероссийской научно-практической конференции, Анапа. 2003; 40–42.
4. Ананьина Ю.В. Зоонозы: роль в инфекционной патологии человека и тенденции эпидемического проявления. Ветеринарная патология. 2004; 3: 29.
5. Ананьина Ю.В. Паразитические и свободноживущие лептоспирсы (семейство *Leptospiraceae*): эколого-генетические особенности. Зоологический журнал. 2009; 89(1): 48–52.
6. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции мирового распространения и проблемы профилактики. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010; 2(51): 13–15.
7. Ахмедов М.М., Аллахвердиев И.И., Кабардиев С.Ш. Методические указания по диагностике и профилактике лептоспироза сельскохозяйственных животных. Махачкала, 1999; 3–10.
8. Басова Н.Ю., Шипицин А.Г., Бель В.В. Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Распространение респираторных болезней молодняка КРС в Краснодарском крае. Междунар. науч.-практ. конф. Воронеж. 2002; 129–130.
9. Белоусов В.И., Абрамов В.Н., Калмыков М.В. Лептоспироз животных в Российской Федерации и меры борьбы с ним. Материалы 10-й Всероссийской научно-практической конференции по лептоспирозу. Москва–Краснодар. 2003; 6–10.
10. Болоцкий И.А., Семенцов В.И., Резникова М.Ф. Изучение эффективных лептоспирозных поливакцин на сельскохозяйственных животных. Лептоспирозы: тезисы доклада VII Всероссийской конференции по лептоспирозам. Тбилиси. 1983; 271–272.
11. Викторова Е.В. Обнаружение лептоспир в органах и тканях животных с помощью ПЦР. Материалы 10-й Всероссийской научно-практической конференции по лептоспирозу. Анапа. 2003; 93–94.
12. Викторова Е.В. Полимеразная цепная реакция при диагностике лептоспироза и изучение органотропности лептоспир у сельскохозяйственных животных. Дис. ... канд. вет. наук. М., 2006.
13. Глушков А.А., Белоусов В.И. Клинико-эпизоотологические особенности бессимптомного лептоспироза КРС и меры борьбы с ним. Новые методы диагностики, лечения и профилактики неинфекционных и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных. М., 1979; 72–73.
14. Глушков А.А. Лептоспироз животных. Лекция МВА. М., 1983; 55.
15. ГОСТ 25386-82. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза.

16. Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Соболева Г.Л., Малахов Ю.А., Непоклонова И.В., Петрова Е.С., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Детекция ДНК *Leptospira interrogans* в образцах животных и человека с использованием полимеразной цепной реакции. II Международная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». 18–19 октября. 2000; 212.
17. Гребенникова Т.В., Викторова Е.В., Соболева Г.Л. Малахов Ю.А. Возможности полимеразной цепной реакции (ПЦР) при диагностике лептоспироза. Мат. 10-го межд. конгресса по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. М., 2002.
18. Джупина С.И. Теория эпизоотического процесса. Ветеринария. 1997; 2: 15–19.
19. Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Соболева Г.Л., Малахов Ю.А., Кальнов С.Л., Алипер Т.И., Непоклонова И.В., Непоклонов Е.А. Применение метода полимеразной цепной реакции для выявления патогенных лептоспир и вируса чумы плотоядных в клинических образцах. Материалы 7-й международной конференции по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. Апрель. 1999. Москва. Россия.
20. Земская М.С., Самсонова А.П. Индикация лептоспир в объектах окружающей среды на модельных системах с помощью ПЦР тест-систем на основе гена, кодирующего липопротеин наружной мембранны LIPL 32. Материалы московской международной конференции «Диагностика, профилактика, и лечение лептоспироза людей и животных». М., 2007; 26–27.
21. Инструкция о мероприятиях по профилактике и оздоровлению животных от лептоспироза. 1992.
22. Киктенко В.С. Очаги лептоспирозной инфекции в природе // Лептоспироз. М., 1985; 150.
23. Малахов Ю.А., Алексин Р.М. Лептоспироз свиней. М.: Колос, 1976; 144.
24. Малахов Ю.А. Особенности эпизоотологии, совершенствование диагностики и специфической профилактики лептоспироза сельскохозяйственных животных. Дис. ... д-ра вет. наук. М., 1978.
25. Малахов Ю.А., Гущин В.Н. Успехи и задачи в борьбе с лептоспирозом животных // Лептоспирозы. Тезисы докладов 8 Всесоюзн. конф. по лептоспирозам. Тбилиси. 1983; 19–20.
26. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных. М.: Агропромиздат, 1992; 238 с.
27. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Успехи и недостатки в борьбе с лептоспирозом животных. Материалы науч. конф., посв. 50-летию Краснодарской НИВС. Ч. 1. г. Краснодар. 1996; 70–72.
28. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Этиологическая структура, меры борьбы и профилактики лептоспироза животных. Сб. материалов научной сессии РАСХН «Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России». М., 1999; 144–147.
29. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Состояние мер борьбы с лептоспирозом животных в Российской Федерации. Сб. материалов научной сессии РАСХН «Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России». М., 1999; 231.
30. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз животных. Ярославль: ДИА-пресс, 2000; 584.
31. Малахов Ю.А., Соболева Г.Л., Лебедев О.А., Сурмило А.П., Викторова Е.В. Оценка методов лабораторной диагностики и специфической профилактики лептоспироза собак. Материалы 9-го международного конгресса по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. М., 2001.

32. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Викторова Е.В. Оценка лабораторных методов диагностики лептоспироза животных. Материалы 10-й Всероссийской научно-практической конф. по лептоспирозу. Москва–Краснодар, 2003; 108–110.
33. Малявин А.Г., Соловьева В.С., Шуплико А.Н. Специфическая активность поливалентной лептоспирозной вакцины. Ветеринария. 1965; 6: 37–39.
34. Маненкова Г.М., Родина Л.В., Тимошков В.В., Цвиль Л.А. Эпидемиология и эпизоотология лептоспирозов в Москве. Матер. 10-й Всероссийской научно-практ. конф. по лептоспирозу. Москва–Краснодар, 2003; 60–62.
35. МУ 3.1.1128-02. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами. Методика. 2002.
36. Набор диагностический скрининговый поливалентный для предварительного выявления специфических антител класса G к возбудителю лептоспироза в сыворотке (плазме) крови животных иммуноферментным методом (ИФА). Инструкция по применению. ООО НПФ «Сиббиотест». 2012.
37. Нафеев А.А., Меркулов А.В., Волкова Е.Г. Заболеваемость природно-очаговыми инфекциями в Ульяновской области. Казанский медицинский журнал. 1998; 6: 465–466.
38. Панин А.Н. Антигенное родство лептоспир серогруппы *Hebdomadis* и этиологическая структура лептоспироза *Hebdomadis* у крупного рогатого скота. Дис. ... канд. вет. наук. М., 1981; 181.
39. Панин А.Н., Малахов Ю.А., Соболева Г.Л., Лебедев О.А., Викторова Е.В. Распространенность и этиологическая структура лептоспироза животных в России. Ветеринария. 2000; 12: 11–14.
40. А.П. Панин, Ю.А. Малахов, Г.Л. Соболева и др. Распространенность и этиологическая структура лептоспироза животных в России. Проблемы биологии и экологической безопасности. Оболенск, 2000; 139–140.
41. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Сборник санитарных и ветеринарных правил. СП 3.1.084-96 и ВП 13.3.4.1100-96. М., 1996.
42. Редька Ю.В., Гольденштейн З.А., Мкртчян М.О. Купальная эпидемическая вспышка лептоспироза в Лабинском районе. Сборник научно-практических работ, посвященных 80-летию санитарной службы. Краснодар. 2002; 73–77.
43. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М., 2007; 524.
44. Соболева Г.Л. Распространенность, этиологическая структура и специфическая профилактика лептоспироза животных. Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2001.
45. Соболева Г.Л., Эпизоотическая и эпидемическая ситуация по лептоспирозу в РФ. Материалы 12-го Международного конгресса по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. М., 2004.
46. Соболева Г.Л. Недостатки в борьбе с лептоспирозом животных. Материалы 15-го международного конгресса по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. М., 2007.
47. Соболева Г.Л., Малахов Ю.А. Лептоспироз крупного рогатого скота. Ветеринария. 2010; 12.
48. Соболева Г.Л. Лептоспироз – болезнь животных и человека. Современная эпизоотическая ситуация. Международная научно-практическая конф. «Балтийский форум ветеринарной медицины 2011». Санкт-Петербург. 2011; 173–178.
49. Соболева Г.Л., Малахов Ю.А., Верховская А.Е. Лептоспироз свиней. Ветеринария. 2012; 4: 3–8.

50. Соболева Г.Л., Непоклонова И.В., Алипер Т.И. Лептоспироз собак. РВЖ МДЖ. 2013; 3: 7–10.
51. Соболева Г.Л., Ананьина Ю.В. Современные особенности эпидемиологии и эпизоотологии лептоспирозов. Материалы VI международного ветеринарного конгресса. Россия. Сочи. 2016; 284–291.
52. Соболева Г.Л., Ананьина Ю.В., Непоклонова И.В. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных. РВЖ МДЖ. 2017; 8: 14–18.
53. Турсуналиев С.Ш., Жунушов А.Т., Турсуналиева К.Ш., Асанбекова Т.Э. О вспышке лептоспироза крупного рогатого скота в Кыргызстане в 2006 г. Материалы московской международной конференции «Диагностика, профилактика, и лечение лептоспироза людей и животных». М., 2007; 67–68.
54. Хитрова А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. Эффективность применения комбинированных вакцин серии Комбовак. Ветеринария. 2006; 9: 17–20.
55. Чехович А.В. Заражаемость крупного рогатого скота в природном очаге лептоспирозов. Тезисы докладов I Всесоюзной конференции. М., 1988; 63–64.
56. Швечкова О. Г. Эпизоотическая вспышка лептоспироза собак в условиях крупного города. Гигиена, вет. санитария и экология животноводства. Мат. Всерос. науч.-произ. конф. Чебоксары. 1994; 485–486.
57. Adler H., Vonstein S., Deplazes P. et al. Prevalence of *Leptospira* spp in various species of small mammals caught in an innercity area in Switzerland. Epidemiol. Infect. 2002; 128: 107–109.
58. Ananyina, Y.V. Human leptospirosis in Russia: epidemiological trends across two decades. European meeting of leptospirosis Eurolept. 2012; Dubrovnic. Croatia. 31 May–2 June 2012. Abstracts. 38.
59. Andre-Fontaine G., Gamere J., Boukerron A. Med. Vet. 1985; 136(10): 693–701.
60. Andre-Fontaine G. Leptospirosis. Infectious and Parasitic Diseases of Livestock. Editors Pierre-Charles Lefevre, Jean Blancou, Rene Chermette, Gerrit Uilenberg. Lavoisier. 2010; 2: 1139–1149.
61. Babudieri B. Vaccine against leptospirosis. Free. Sth. int. Hectboil. Standordisation. Jerasolim. 1959; 313–350.
62. Blowey Roger W., Weaver A. David. Color atlas of Diseases and Disorders of Cattle. MOSBY ELSEVIER. Third edition. 2011;
63. Chen T.Z. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. Ann. Immunol. Hung. 1986; 26: 125–151.
64. Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J and Ellis WA. Effect of vaccination against *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* on milk production and fertility in dairy cattle. Veterinary Record. 1996a; 138: 334–335.
65. Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J and Ellis WA. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection. Veterinary Record. 1996b; 139: 110–114,
66. Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA and Baker JR. Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after experimental 91 intrauterine inoculation with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Research in Veterinary Science. 1996. 60: 157–162.
67. Grebennikova T.V., Zaberezhny A.D., Soboleva G.L., Malakhov Y.A., Nepoklonova I.V. Aliper T.I., Nepoklonov E.A. Detection of *Leptospira interrogans* in human and animal samples using polymerase chain reaction. 10<sup>th</sup> European Congress of clinical Microbiology and Infection Diseases. Stockholm. Sweden. May. 2000; 48.

68. Green C.E. Infectious Diseases of the dog and cat. Fourth Edition. 2012.
69. Gsell O. The History of Leptospirosis: 100 Years. ZentralBlatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1984; 257(4): 473–478.
70. Easterbrook J.D., Kaplan J.B., Vanasco N.B., et al. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. Epidemiol. Infect. 2007; 135: 1192–1199.
71. Ellis W.A., O'Brien J.J., Cassells J.A. Role of cattle in the maintenance infection in Northern Ireland. Veterinary Record. 1981; 108: 555–557.
72. Ellis W.A., O'Brien J.J., Neill S.D., Ferguson H.W. & Hanna J. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted cows. Vet. Rec. 1982; 110: 147–150.
73. Ellis W.A., O'Brien J.J., Neill S.D. & Hanna J. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. Vet. Rec. 1982; 110: 178–180.
74. Ellis T.M., Robertson G.M., Hustas L. & Kirby M. Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. Aust. Vet. J. 1983; 60: 364–367.
75. Ellis W.A., Bryson D.G., Neill S.D., McParland P.J. and Malone F.E. Possible involvement of leptospires in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. Veterinary Record. 1983; 112: 291–293.
76. Ellis W.A., O'Brien J.J., Bryson N.G., Mackie D.P. Bovine leptospirosis: Some clinical features of serovar hardjo infection. Veter. Rec. 1985; 117(5): 101–104.
77. Ellis W.A., O'Brien J.J., Cassells J.A. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. Res. in veter. Sc. 1985; 39: 296–298.
78. Ellis W.A., Songer J.G., Montgomery J. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. Veterinary Record. 1986; 118: 11–13.
79. Ellis W.A. The diagnosis of leptospirosis in farm animals // The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control, Ellis W.A. & Little T.W.A., eds. Martinus Nijhoff. Dordrecht. The Netherlands. 1986; 13–31.
80. Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice. 1994; 10: 463–78.
81. Ellis W.A. Leptospirosis. In book: Diseases of swine, 10 th edition. Edited by Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro R. Ramires et al. 2012.
82. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization. Geneva. 1982.
83. Fang F. Leptospirosis diagnostics and exposure at the human and animal interface in New Zealand. 2014; 346 p.
84. Fulton R.W., Briggs R.E., Payton M.E. et al. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. Vaccine. 2004; 22: 643–649.
85. Jarlath Nally. The ins and outs of persistent renal leptospirosis. 3<sup>rd</sup> ELS Scientific Meeting on leptospirosis and rodent borne haemorrhagic fevers. Alghero-Sardinia. 2018; 20.
86. Khairani-Bejo S., Bahaman A.R., Zamri-Saad M., Mutalib A.R. The survival of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in the Malaysian environment. J. of Animal and Veterinary Advances. 2004; 3(3): 123–129.
87. Kmety E., Dikken H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and History of its serovars. Netherlands. 1993.
88. Mario D'Incau. Surveillance of animal Leptospirosis in Italy. 3<sup>rd</sup> ELS Scientific Meeting on leptospirosis and rodent borne

- haemorrhagic fevers. Alghero-Sardinia. 2018; 17.
89. Moening V., Kramer M. Infektionsmedizinscht Herausforgerungen. Tierarztl Umsch. 2000; 55(8–9): 428–436.
  90. Nenad Turk. Leptospirosis in Europe — neglected disease of natural focus. 2nd ELS meeting on leptospirosis and other rodent borne haemorrhagic fevers. Amsterdam. 16–18 April. 2015.
  91. OIE. Terrestrial Manual. Chapter 2.1.9. Leptospirosis. 2008.
  92. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.12. Leptospirosis. 2014.
  93. Paiva-Cardoso M.N., Collares-Pereira M., Gilmore C., Santos-Reis M., Rodrigues J., Ellis W.A. Cattle incidental infections due to *Leptospira* strains carried by small mammals in Tras-os-Montes e Alto Douro region, northern Portugal. Abstracts. Presentation. European meeting of leptospirosis Eurolepto 2012. Dubrovnic. Croatia. 31 May–2 June 2012.
  94. Picardaeu M. *Leptospira* spp.: from the genetics to pathogenesis. European Meeting of leptospirosis. Eurolepto 2012.
  95. Pituco E.M. Fava C. del. Infectious causes of embryonic and fetal mortality in bovines. Revista Brasileira de Reproducao Animal. 2003; 27(2): 68–75.
  96. Ponti N., Palmac B., Novorol M. et al. Current Situation as Leptospirosis in Sardinia. Abstracts. Presentation. European meeting of leptospirosis. Eurolepto 2012. Dubrovnic. Croatia. 31 May–2 June 2012.
  97. Sejvar J., Bancroft E., Winthrop K. et al. Leptospirosis in “Eco-Challenge” Athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9(6): 702–707.
  98. Soboleva Galina, Aliper Taras, Nepoklonova Irina, Demkina Marianna, Belousov Vasily, Nurlygaianova Gulnara. Serological aspects of leptospirosis of animals in the Russian Federation. 3rd ELS Scientific Meeting on leptospirosis and rodent borne haemorrhagic fevers. Alghero-Sardinia. 2018; 90.
  99. Talpada M.D., Garvey N., Sprowls R., Eugster A.K., Vinetz J.M. Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2003; 3(3): 141–147.
  100. Terpstra W.J. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization and International Leptospirosis Society. 2003; 110.
  101. Tornton R. Bovine abortion diagnoses in 1995. Surveillance-Wellington. 1996; 23(4): 21–22.
  102. Trapp S., Konig P., Beer M. Conventional and marked BHV-1 vaccines in Germany: a brief review. Berl. Munch Tierarztl Wochenschr. 2003; 116(5–6): 208–215.
  103. Treml E., Sebek Z., Hejlicehll K. Flocne nozsireni profilatch proti leptospiram v jednotiivych zemedeskych sadoch okresu, zjistovana na zaklade Serologick-eho vysetroni, jatecne — ho skotu a prasat. Veter. Med.(Praha). 1984; 531–537.
  104. Peter D. Constable, Kenneth W. Hinchcliffe, Stanley H. Done, Walter Grunberg. A textbook of the diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. Veterinary medicine. 2017; 11(2).
  105. Vidal S., Syring C., Rodriguez-Campos S. Implications of *Leptospira* spp. in bovine abortion 2<sup>nd</sup> ELS meeting on leptospirosis and other rodent borne haemorrhagic fevers. Amsterdam. 16–18 April. 2015.
  106. WHO Recommended Surveillance Standards. WHO. 1999.

# ИНФЕКЦИОННЫЙ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫЗВАННЫЙ *MORAXELLA BOVIS*

Капустин А.В., Лашевцев А.И., Иванов Е.В.

**Инфекционный кератоконъюнктивит (*Keratoconjunctivitis*)** — широко распространенное, полиэтиологичное, остро протекающее и быстро распространяющееся заболевание крупного рогатого скота. Патология также известна как моракселлез (*Moraxellosis*). Инфекция проявляется лихорадкой, угнетением и поражением глаз — катаральным конъюнктивитом, гнойно-язвенным кератитом, светобоязнью, слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивальных оболочек, серозно-гнойными истечениями, помутнением роговицы, в том числе с изъязвлениями, деформированием глазного яблока, болезненной реакцией на свет, частичной или полной потерей зрения. Заболевание свойственно многим видам жвачных животных во всем мире, включая оленей, бизонов, антилоп, верблюдов, коз, овец и т.д., несмотря на то, что в России моракселлезу подвержен именно крупный рогатый скот ввиду его повсеместного распространения. Именно ИКК считается самым опасным заболеванием глаз животных во всем мире, а грамотрицательные бактерии вида *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* считаются основными его возбудителями. В случае развития инфекции возможно одновременное поражение обоих глаз или одного из них, но на разных стадиях заболевания. Несмотря на низкую смертность, инфекционный кератоконъюнктивит характеризуется высокой заболеваемостью и массовым выбытием животных, поскольку у ослепших животных наблюдается существенное снижение продуктивности [15, 17, 20].

**Этиология.** Инфекционный кератоконъюнктивит у КРС, проявляющийся однотипными клиническими признаками, может вызываться разными возбудителями, не являющимися близкими по фенотипическим и генотипическим свойствам. Считается, что возбудителем инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в большинстве случаев являются бактерии *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, относящиеся к семейству *Moraxellaceae*. В качестве дополнительных агентов (вторичных) чаще всего выступают телязии, а также различные микроорганизмы: риккетсии, хламидии, вирусы, микоплазмы, листерии. Кроме того, достаточно часто из конъюнктивальных смызов выделяются условно-патогенные микроорганизмы, распространенные в окружающей среде. Отдельная группа авторов считает, что каждый из перечисленных выше патогенов может быть первопричиной болезни. Предполагает к заболеванию высокая солнечная активность, большое количество насекомых, высокая трава и наличие кустарников на пастбище, что приводит к травмам глаз. На течение заболевания влияет уровень ультрафиолетового излучения и нехватка витамина А [9, 11, 14, 16].

Род *Moraxella* является членом семейства *Moraxellaceae*, представляя собой грамотрицательные коккобациллы. Преимущественно представители данного вида неподвижны в жидкости, однако некоторые виды имеют «подергивающуюся» мобильность. Установлено, что *Moraxella bovis* способна выживать до

Таблица 1. Виды бактерий рода *Moraxella*, вызывающие поражения глаз

Вид	Заболевание
<i>Moraxella bovis</i>	Вызывает кератоконъюнктивит рогатого скота
<i>Moraxella bovoculi</i>	Вызывает кератоконъюнктивит рогатого скота
<i>Moraxella ovis</i>	Вызывает кератоконъюнктивит овец, зачастую в ассоциации с <i>Moraxella bovis</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	Вызывает кератоконъюнктивит и кератит у людей
<i>Moraxella canis</i>	Вызывает конъюнктивит собак и кошек
<i>Moraxella equi</i>	Вызывает конъюнктивит и эрозию эпителия краев век у лошадей

3 дней на лапках насекомых, в частности мух жигалок.

Наиболее важные представители бактерий рода *Moraxella* для животных и людей, вызывающих поражения глаз, отраженные в табл. 1.

При окраске методом Грама оба микроорганизма представляют собой грамотрицательные диплококки с вариабельной формой от кокка до коккобациллы. Изоляты, которые имеют форму стержня, варьируют в размерах  $1,0-1,5 \times 1,5-2,5$  мкм, а изоляты, которые имеют форму кокка, имеют размеры в диапазоне 0,6–1,0 мкм. В мазках клетки расположены одиночно, парно или в виде больших скоплений (рис. 1). Данные виды микроорганизмов являются плеоморфными.



Рис. 1. Клетки *Moraxella bovis* при окрашивании их методом Грама

Колонии *Moraxella bovoculi* при росте на кровяных питательных средах имеют диаметр менее 1 мм, цвет от белого до бело-серого оттенка. Колонии круглой и выпуклой формы с ровным краем и

влажной поверхностью. Большинство штаммов являются бета-гемолитическими на 5% агаре крови овец (рис. 2). Оптимальная температура для роста — 35–37°C. Возможность рости при 25 и 42°C является переменным свойством. Рост отсутствует на агаре MacConkey, агаре *Salmonella-Shigella*, цитратном агаре Симмонса, агаре ацетата натрия или питательном агаре с 6% NaCl.



Рис. 2. Рост гемолитической культуры *Moraxella bovoculi* на кровяной среде

Свежевыделенные изоляты *Moraxella bovis* на питательных средах, содержащих дефибринированную кровь барана, образуют полусферические плоские колонии размером до 1 мм в диаметре в течение 48 ч. Большинство штаммов, выделенных от крупного рогатого скота, образуют различные гемолитические зоны вокруг колоний на кровяном агаре. Микроорганизмы являются прихотливыми к питательным средам. Не спосо-

Таблица 2. Культурально-морфологические и биологические свойства бактерии рода *Moraxella*

Показатель	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>
Морфология	палочки, диплобациллы	кокки, диплококки
Тип колоний	R	S
Подвижность	– (дергающиеся)	–
Гемолиз	+	+
Каталазная активность	+	+
Оксидазная активность	+	+
Разжижение желатина	+	–
Редукция нитратов	–	+
Сахаролитические свойства	–	–
Гидролиз твина 80	+	+
Уреазная активность	–	–
Цитрат	–	–
Фенилаланин дезаминазная активность	–	+
Ферментация в лактусовом молоке	+	–

+ — положительное значение теста;  
— — отрицательное значение теста.

бены растя на агаре MacConkey или в средах, содержащих аммоний и ацетат. Оптимальная температура для роста составляет 35–37°C.

Биохимические свойства бактерий вида *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* приведены в табл. 2.

**Эпизоотология.** К заболеваниям, вызванным *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, восприимчивы следующие животные: КРС, овцы, козы, олени, лошади. Некоторые виды моракселл были выделены из конъюнктивы и носовых полостей крупного рогатого скота, овец, лошадей, слюны собак и кошек, ротовой полости и глотки морских свинок и кроликов, носовой полости коз, половых путей свиней, кишечника коз, половых путей овец и крупного рогатого скота. Бактерии рода *Moraxella* распространены по всему миру, особенно в странах Азии, Африки, Австралии, Северной и Южной Америке, Европы. Большую роль в распространении инфекционного кератоконъюнктивита, появлении стационарно неблагополучных очагов ИКК играет завоз племенного крупного рогатого скота из-за рубежа, перевозка

инфицированного скота между хозяйствами и регионами. В СССР первые вспышки заболевания у крупного рогатого скота были описаны в 70–80-е годы в хозяйствах Иркутской, Гомельской областей, Северо-Западного региона [1, 2, 752, 18, 21].

В числе основных этиологических причин инфекции многие авторы указывают бактерии рода *Moraxella*, но при этом определенную роль играют листерии, риккетсии, микоплазмы, хламидии, вирусы (возбудители ИРТ, ВД и др.). ИКК значительно осложняет тилязиоз и его ассоциированная форма.

Источником инфекции являются больные или инфицированные животные. Возбудители заболевания могут длительно персистировать в конъюнктивальном мешке глаз и в носовых ходах животных-бактерионосителей [22].

Наиболее частым путем распространения возбудителей является контактный, но не исключен и аэрозольный путь заражения. Одним из самых важных факторов распространения ИКК являются мухи, на теле которых возбудитель может выживать до трех дней. Существует по-

ложительная корреляция между количеством мух на одно животное на ферме и инфекцией. Заболевание обостряется на фоне перевозок, перегруппировок скота, ведущих к стрессам, при этом, как правило, увеличивается число новых клинически выраженных моракселлезов [12, 13]. Заражение скота часто связано с перемещением больных животных или носителей из одного предприятия в другое, что является одним из основных путей распространения. При аэрозольном заражении возбудитель передается через капельки слюны и носовых истечений, попадающих на открытые слизистые оболочки окружающих животных. Также возбудители передаются через общие кормушки и поилки.

Важную роль в возникновении, распространении и тяжести течения инфекционного кератоконъюнктивита играют окружающая среда, сезонность, сопутствующая микрофлора, иммунная система животного. Минеральные недостатки, такие как дефицит селена и меди, также являются дополнительными факторами риска, которые следует учитывать при ведении стада КРС. Особое внимание нужно обратить на то, что важной причиной возникновения инфекций, обусловленных условно-патогенными микроорганизмами, является нарушение иммунного гомеостаза, связанного с понижением иммунитета. Такие расстройства особенно зависят от действия стрессовых факторов, загрязнения окружающей среды, использования длительной антибактериальной терапии и от связанных с ней инфекций. Важной группой факторов, предрасполагающих развитие инфекционного кератоконъюнктивита, являются функциональные нарушения иммунной системы. В том числе сюда относят иммуносупрессию, возникающую одновременно с инфекциями других патогенов.

Инфекции чаще всего наблюдаются в период года, когда активно размножаются разносчики возбудителя, а именно мухи. Наиболее часто ИКК проявляется в теплое время года: весной (21,4%), летом (29,3%) и максимально осенью (до 45%). Пик распространенности приходится на период высокого уровня ультрафиолетового излучения и активности насекомых. Во вновь возникших очагах ИКК протекает остро, в течение 20–30 дней охватывая практически 100% поголовья. Молодняк, переболевший острой и хронической формами ИКК, устойчив к повторному заболеванию либо переболевает в легкой форме. В неблагополучных очагах заболевают вновь поступившие животные либо родившиеся в текущем году [5, 7].

Несмотря на большую контагиозность, ИКК не приводит к большой смертности, даже правильнее сказать, что отмечаются единичные летальные случаи. Смерть, как правило, наступает после поражения бактериальной флорой зрительного нерва, откуда возбудитель распространяется до подпаутинного пространства головного мозга, тем самым вызывая невосстановимые изменения на фоне менингита. Экономические потери очень весомые, поскольку вследствие поражения одного или двух глаз развивается слепота, после чего животных выбраковывают, так как резко падает продуктивность скота, телята отстают в росте, у коров падают удои. Заболевание также сопровождается большими экономическими тратами на проведение оздоровительных и лечебно-профилактических мероприятий [3].

**Патогенез.** Микроорганизмы *M. bovis* и *M. bovoculi* содержат известные факторы патогенеза, в том числе оперон класса Repeats-in-Toxin (RTX), который кодирует цитотоксин, лизирующий и убивающий нейтрофилы и эпителиальные клетки роговицы, и ген пилина, который

требуется для присоединения к эпителию роговицы.

В геноме *M. bovis* были обнаружены гены, отвечающие за детоксикацию тяжелыми металлами и устойчивость к антибиотикам.

Основные белки патогенности — пилин и цитотоксин (гемолизин, цитолизин). Они позволяют бактерии придерживаться поверхности роговицы. Цитотоксин лизирует бычья нейтрофилы, эритроциты, лимфоциты и эпителиальные клетки роговицы, приводящие к изъязвлению роговицы.

Возбудители ИКК проникают через конъюнктиву и вызывают серозно-катаральное воспаление. Вследствие нарушения целостности эпителиальных клеток появляются условия для вторичной микрофлоры. Тяжесть течения болезни напрямую зависит от уровня ультрафиолетового излучения в этот период.

Клеточная стенка моракселл состоит из белков и липосахарида, являющихся одним из факторов механизма развития моракселл, зависит от гемолизина, образуемого микроорганизмами в течение логарифмической стадии роста. Гемолизин встраивается в плазматические мембранные клеток хозяина и формирует в ней поры, из-за чего нарушается проницаемость мембранных, увеличивается внутриклеточное давление, что в итоге вызывает ее гибель. При инъекции под роговицу гемолитических фракций патогенных штаммов моракселл наблюдается инфекционный кератоконъюнктивит, в то же время при заражении негемолитическими культурами бактерий поражение глаз не происходило.

Молодняк крупного рогатого скота, переболевший ИКК, становится устойчивым к повторному заражению в дальнейшем. У таких особей выявлены антитела к гемолизину, которые нейтрализуют различные штаммы. Хотя фим-

брии и гемолизин являются основными факторами патогенности моракселл, в развитии ИКК также важное место занимают эстеразы, липазы, фибринолизины и т.д.

**Клинические признаки.** Инкубационный период длится от 2 до 20 дней, при этом может поражаться как один, так и оба глаза. При осмотре отмечается отечность век, конъюнктивит, слезотечение. Эксудат может быть слизистой консистенции или гнойным. В начале заболевания фиксируется повышение температуры тела и ухудшение зрения, состояние животного угнетенное. Животные отказываются от корма и воды, что ведет к исхуданию и обезвоживанию. При пальпации выявляют повышение местной температуры, болезненность области глаза, припухлость век. В динамике выделяют несколько стадий развития болезни: 1) катаральный конъюнктивит, светобоязнь, серозное слезотечение, блефароспазм; 2) паренхиматозный кератит, отек роговицы; 3) гнойный кератит, язва роговицы, помутнение роговицы; 4) гнойный кератоконъюнктивит, перфорация роговицы; 5) гнойная панофтальмия, слепота.



Фото 1



Фото 2



Фото 3



Фото 4

У части животных может фиксировать- ся выбухание помутневшей части рогово-вицы и развитие язвы, приводящее к слепоте. Болезнь продолжается 8–10 дней и в большинстве случаев заканчивается выздоровлением. Но при несвоевремен- ном лечении выздоровление замедляется на несколько недель или месяцев, на роговице сохраняются мелкие очажки помутнения и рубцы. Активация секун- дарной микрофлоры ведет к окончатель- ной слепоте или потере глаза. Роговица глаза при этом мутнеет, приобретает жел- товатый оттенок, развивается гнойный панофтальмит и язва. Возможно пробо- дение роговицы, выпадение хрусталика и атрофия глазного яблока.

**Диагноз.** Диагноз устанавливается на основе эпизоотических данных и кли-нических признаков. Окончательный диагноз определяется на основе лабо-раторно-диагностических исследова-ний. Дифференциальная диагностика проводится с заболеваниями, имею-щими наибольшую схожесть клинических признаков, т.е. инвазионного ке-ратоконъюнктивита, герпесвирусной инфекции (тип 1), злокачественной катаральной горячаки (возбудитель *Herpesvirus bovis*-3), хламидиозного кератоконъюнктивита (возбудитель *Chlamydophila pecorum*), микоплазмоз-ного кератоконъюнктивита (вызван-ный *Mycoplasma bovoculi*) и т.д. Важ-ными диагностическими признаками являются конъюнктивит, светобоязнь, истечения из глаза, эрозия роговицы, ухудшение зрения, кератоконъюн-ктиvit. Для бактериологического и вирусологического исследований от больного животного отбирают пробы от отделяемого глаза, которые отправля-ют в лабораторию. Взятие проб произ-водят сухим стерильным ватным там-поном из конъюнктивального мешка. Полученные пробы доставляют в тер-мосе со льдом в лабораторию.

Окончательный диагноз устанавливают по результатам лабораторного исследования клинического и патологического материалов. Диагноз считают установленным, если выделена чистая культура бактерий рода *Moraxella* с зоной бета гемолиза, определена родовая и видовая принадлежность изолята на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств и подтверждена патогенность гемолитических форм бактерий *Moraxella*.

**Лечение.** Терапия состоит в применении общеукрепляющих препаратов и глазных капель или мазей с антибиотиками широкого спектра действия. Так, виды *Moraxella*, за исключением *Moraxella catarrhalis*, восприимчивы к пенициллину, цефалоспоринам, тетрациклинам, хинолонам и аминогликозидам. Быстро начатое лечение при появлении первых признаков заболевания приводит к выздоровлению больных животных и отсутствию серьезных последствий поражения глаз. Лечение должно проводиться циклами не менее 5–7 дней, при этом ежедневно глаз обрабатывают от 3 до 5 раз, внося в конъюнктивальный мешок антимикробные препараты и 0,5%-ный раствор новокаина. Целесообразно предварительно проводить исследование чувствительности выделенной из глаза микрофлоры к антимикробным препаратам, используемым в офтальмологии.

В теплое время года для защиты восприимчивых животных от зоофильных мух, клещей и др., проводят групповые обработки водными эмульсиями инсектицидных препаратов (пиреметрина, циперметрина, дельтаметрина).

Заболевших животных изолируют в затемненном помещении, обеспечивают покой и на период лечения защищают глаза от света, попадания пыли, насекомых.

**Профилактика.** Профилактика ИКК крупного рогатого скота основана на про-

ведении комплекса организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных, специфических мероприятий. Профилактические мероприятия складываются из визуального осмотра и изоляции выявленного зараженного животного. Для предупреждения занесения возбудителя инфекции в хозяйства важно комплектовать стада здоровыми животными из благополучных предприятий; обязательное карантинирование вновь поступивших животных проводят в течение 30 дней. В помещениях проводят регулярные профилактические аэрозольные дезинфекции, механическую очистку стен, полов, кормушек, полов.

Бактерии чувствительны к влажному теплу (121°C в течение по меньшей мере 15 минут) и сухому теплу (160–170°C в течение по меньшей мере 1 часа). Моракселлы восприимчивы к 2–5% фенолу, 1% гипохлориту натрия, 4% формальдегиду, 2% глутаральдегиду, 70% этанолу, 70% пропанолу, 2% перуксусной кислоте, 3–6% перекиси водорода и йода.

Иммунитет и специфическая профилактика. На сегодняшний день специфическая профилактика инфекционного кератоконъюнктивита, вызванного моракселлами, у крупного рогатого скота — наиболее эффективный метод борьбы с инфекционными заболеваниями. В Российской Федерации в настоящее время зарегистрированы два препарата для профилактики инфекционного кератоконъюнктивита:

— вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, изготовленная из инактивированных бактериальных клеток моракселл *Moraxella bovis* (штамм Г97-ВНИВИ), *Moraxella bovoculi* (штамм СХ-Ч6), адсорбированных на геле гидроокиси алюминия (10% к объему). Иммунитет к ИКК у крупного рогатого скота фор-

мируется через 14–16 суток после двукратного введения, продолжительность достигает 12 месяцев;

— ассоциированная вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса I типа. Вакцина содержит антигены гемолитических форм бактерий *Moraxella bovis* (штаммы Г97-ВНИВИ и Ш3-01) и герпесвируса крупного рогатого скота (штамм ТКА-ВИЭВ-В2), адсорбированные на геле гидроокиси алюминия. Вакцина вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота на 21–30-й день после второй прививки, который сохраняется в течение 12 месяцев.

Помимо указанных вакцин есть упоминания о ряде перспективных разработок, но в продажу данные препараты не поступают.

## Литература

1. Андриасян В.Б. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота в Северо-Западной зоне РСФСР. Сб. науч. тр. Ленинградского вет. ин-та. 1998; 6–11.
2. Бобырь В.К. Инфекционные кератоконъюнктивиты крупного рогатого скота в хозяйствах Гомельской области. Сб. науч. тр. Львовского ветеринарного института. 1974; 39: 167–169.
3. Валебная Л. В. Биологическая характеристика бактерий *Moraxella bovis* и клинико-эпизоотологические особенности инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2007.
4. Гаффаров Х.З., Валебная Л.В., Спиридовон Г.Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота в регионе среднего Поволжья и Предуралья. Ветеринарная патология. 2003; 3: 95–97.
5. Карайченцев В.Н. Диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*. Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе». СПб., 2004; 48–49.
6. Крапивина Е.В., Песенко Е.А. Эффективность двух схем лечения инфекционного кератоконъюнктивита телят. Сборник трудов межд. науч. практической конф. Актуальные проблемы инновационного развития животноводства. 2020; 159–163.
7. Русинов А.Ф. Дифференциальная диагностика кератоконъюнктивита. Ветеринария. 1984; 12: 30–32.
8. Спиридовон Г.Н. и др. Биологические свойства бактерий *Moraxella Bovoculi* — возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Ветеринарный врач. 2017; 3: 133–138.
9. Спиридовон Г.Н., Гаффаров Х.З., Никитин А.И. Методические рекомендации по диагностике, лечению и специфической профилактике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызванного бактериями *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. 2017.
10. Adinarayanan N., Singh S.B. Infectious bovine keratitis with special reference to isolation of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 1961; 73: 694–696.
11. Angelos J.A., Ball L.M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J. Vet. Diagn. Invest. 2007; 19: 532–534.
12. Arora A.K. Studies on *Moraxella bovis* isolated from cattle affected with or convalescing from infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet. Arhiv. 1989; 59(1): 17–23.
13. Brown M. H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. Journal of

- Veterinary Internal Medicine. 1998; 12(4): 259–266.
14. Comin H. B. et al. Genetic differences among *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) outbreaks in southern Brazil. Genetics and Molecular Biology. 2020; 43(2).
  15. George L.W. Antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis. Cornell. Vet. 1990; 80: 229–235.
  16. Kowalski A.P., Maboni G., Gressler L.T., Espíndola J.P., Balzan C., Tasca C., Guizzo J.A., Conceição F.R., Frandoloso R. and Vargas A.C. Antigenic characterization of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* strains with potential use in vaccines. Vet. Microbiol. 2017; 210: 56–63.
  17. McConnel C, Shum L. and House J. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine Moraxella isolates. Aust. Vet. J. 2007; 85: 70–71.
  18. Angelos J.A., Spinks P.Q., Ball L.M., George L.W. *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratokonjunctivitis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007; 57: 789–795.
  19. O'Connor A.M., Brace S., Gould S., Dewell R. and Engelken T. A randomized clinical trial evaluating a farm-of-origin autogenous *Moraxella bovis* vaccine to control infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye) in beef cattle. J. Vet. Intern. Med. 2011; 25: 1447–1453.
  20. Postma G.C., Carfagnini J.C. and Minatel L. *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis. 2008; 31: 449–458.
  21. Rogers D. G., Cheville N. F., Pugh Jr G. W. Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. Veterinary pathology. 1987; 24(4): 287–295.
  22. Vandergaas N., Rosenbusch R.F. Infectious bovine keratoconjunctivitis epizootic with area wide emergence of a new *Moraxella bovis* pilus type. Am. Vet. Res. 1989; 50: 1437–1441.

# ЭМФИЗЕМАТОЗНЫЙ КАРБУНКУЛ

Капустин А.В.

**Введение.** Эмфизематозной карбункул — острая инфекционная болезнь крупного рогатого скота, энзоотически возникающая в неблагополучных районах во время пастбищного, реже стойлового периода. Случаи эмкара описаны и у овец, но, в отличие от крупного рогатого скота, заболевание часто связано с попаданием возбудителя через раны, из-за чего эмкар у овец стоит рассматривать как заболевание, ассоциированное со злокачественным отеком [16, 20, 32].

Возбудитель эмфизематозного карбункула *Clostridium chauvoei* вызывает обширные поражения различных систем и тканей организма, сопровождающиеся быстро нарастающим токсикозом, тяжелым очаговым поражением мускулатуры в виде крепитирующих некрозов, серозно-геморрагической инфильтрацией и смежной с ними подкожной клетчатки, практически в 100% случаев заканчивающиеся летально. Эмфизематозный карбункул является серьёзной проблемой скотоводства не только за счет нанесения экономического ущерба из-за заболевания и гибели животных, но также из-за возникновения стойкого неблагополучия местности, контаминированной спорами возбудителей, и потерю от наложения карантинных мероприятий и ограничений. Болеет крупный и мелкий рогатый скот в основном до трёхлетнего возраста [5, 16, 23, 30].

**Этиология.** Возбудитель эмфизематозного карбункула *Clostridium chauvoei* был выделен в 1876 г. Боллингером и Фезером, а затем изучен и описан Арлуненом и Томасом в 1881–1884 гг., давшими ему название в честь французского ученого J.B.A. Chauveau [5, 16, 25].

Клостридии этого вида относятся к строгим анаэробам и представляют собой полиморфные споросодержащие грамположительные подвижные палочки с закругленными концами, размером  $0,4 \times 0,6\text{--}2 \times 8$  мкм, расположенные одиночно или короткими цепочками. Споры расположены центрально, субтерминально или лежат свободно, форма спор овальная. В молодых, активно растущих культурах, а также в патологическом материале клетки микроорганизма окрашиваются грамположительно, при дальнейшем культивировании становятся грамотрицательными, а за счет образующихся спор приобретают веретено- или лимонообразные формы. Споры длительно сохраняются в почве, представляя опасность для заражения восприимчивых животных [7, 9, 11, 16, 34].

На жидких питательных средах растут интенсивно со слабым газообразованием. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, желатин разжижают, молоко медленно свертывают. В мозговой среде не дают почернения. Образуют незначительное количество индола. Помутнение при росте в среде Китта–Тароцци наступает через 16–20 часов, но уже через 30–48 часов рост прекращается, наступает постепенное просветление среды с выпадением осадка, который при интенсивном встряхивании разбивается в равномерную взвесь.

На кровяном сахарном агаре образует круглые колонии в виде перламутровой пуговицы или в виде виноградного листа с зоной гемолиза.



Рис. 1. Колония *C. chauvoei* в виде виноградного листа с четко выраженной зоной *b*-гемолиза

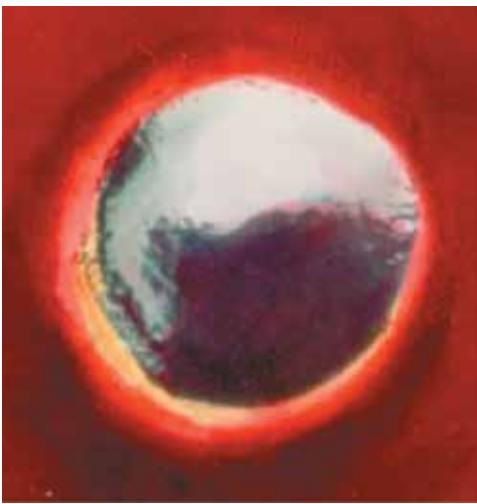


Рис. 2. Колония *C. chauvoei* в виде перламутровой пуговицы с четко выраженной зоной *b*-гемолиза

**Патогенез.** Несмотря на отсутствие четко выраженной токсигенности, *Clostridium chauvoei* имеет значительное количество факторов вирулентности, таких как токсин CctA, обладающий гемолитической и цитотоксической активностью, холестерол-зависимые цитолизины, участвующие в патогенезе гангренозных

поражений, гиалуронидаза, ДНК-аза, нейраминидаза. Кроме того, считается, что в значительной степени инфекционному процессу способствуют жгутики *C. chauvoei*, обеспечивающие распространение возбудителя по тканям организма [1, 13, 16, 24, 28].

Зарождение животных чаще происходит через поврежденные оболочки пищеварительного тракта, куда бактерии попадают с кормом, загрязненным почвой, реже воротами инфекции становятся открытые раневые поверхности. Доказанным считается также перенос возбудителя слепнями [16, 26].

Преодолев барьер слизистых, *C. chauvoei* разносится кровью по органам и тканям. Локализуется в мышечной ткани, где начинает размножаться, выделяя газ, токсины и агрессины. Под их воздействием происходят дистония кровеносных сосудов, мукOIDное набухание миоцитов, увеличение проницаемости стенок капилляров и развитие отека в межмышечной ткани. Экзотоксины и споры распространяются с отечной жидкостью и экссудатом в другие органы и ткани. Усиление интоксикации организма приводит к возникновению дистрофических процессов в миокарде, легких, печени, почках и других органах. Причиной смерти животных становится паралич миокарда [10, 16, 23, 27].

**Клинические признаки.** Инкубационный период при эмфизематозном карбункуле длится от 2 до 3, реже до 5 дней. Болезнь протекает остро с незначительным повышением температуры до 40,5–41°C, но чаще температура тела больного животного остается в пределах нормы. В наиболее острый случаях животных находят мертвыми без клинических признаков. При естественном заражении первыми клиническими признаками болезни являются выраженные

ная хромота на одну из конечностей и нарушение координации движений. В течение полутора–двух суток в различных участках тела (чаще в мышцах ягодичной и бедренной групп, мышц шеи и подчелюстного пространства) образуются болезненные, плотные, горячие на ощупь припухлости, при надавливании на которые слышны звуки крепитации. Очаги быстро увеличиваются в размерах. По мере развития патологического процесса отеки становятся холодными и безболезненными. Болезнь сопровождается хромотой, угнетением, гипотонией преджелудков, отмечают также гипертермию, отказ от корма, прекращение жвачки, одышку, тахикардию. В редких случаях, когда затронут язык, местная припухлость может вызывать выпячивание этого органа за пределами рта [16].

Гибель наступает в течение 24–72 часа практически в 100% случаев.

Иногда болезнь протекает подостро и хронически, при этом болезнь проявляется потерей аппетита, слабо выраженным угнетением, коликами, небольшими болезненными отеками мышечной ткани. Такие случаи, как правило, оканчиваются выздоровлением с последующим формированием стойкого пожизненного иммунитета.

**Патологоанатомические изменения.** Характерными патолого-анатомическими признаками эмфизематозного карбункула являются сильное вздутие трупа вследствие интенсивного газообразования в преджелудках и пораженных мышцах, выделение пенистой кровянистой жидкости из естественных отверстий. Специфические поражения могут обнаруживаться в любых мышцах, включая сердце, но, как правило, это наиболее мощные мышцы в области бедер, крупка, поясницы и плеча. Часто

развитию эмфизематозного карбункула предшествуют травмы, в том числе закрытые. Мышечная ткань и межмышечные прослойки, смежные с некротическими очагами, инфильтрированы серозным экссудатом с пузырьками газов, при разрезе на месте поражения выделяется кровянистая пенистая жидкость, от которой исходит запах прогорклого масла. Кожа пораженного участка напряжена, истончена, сине-серого цвета, иногда некротизирована. Шерсть легко снимается. Регионарные лимфатические узлы в состоянии серозно-геморрагического лимфаденита.

Одним из наиболее характерных патологоанатомических изменений при эмфизематозном карбункуле является переполненный желчный пузырь, увеличенный в 5–10 раз по сравнению с нормой [16, 24, 29, 32].



Рис. 3. Поражение мышц левой тазовой конечности



Рис. 4. Темно-красная, почти черная окраска мышечной ткани в очаге поражения  
*Cl. chauvoei*



Рис. 5. Выделение пузырьков газа



Рис. 6. Увеличение желчного пузыря при эмкаре

Помимо скелетных мышц, значительные поражения обнаруживают в миокарде, при этом перикард диффузно-геморрагичный, может быть покрыт тонким слоем фибрина и содержать значительное количество жидкости. Может наблюдаться фибринозный плеврит в

областях, прилегающих к сердцу, легкие всегда отечны.

Следует учесть, что при подозрении на эмфизематозный карбункул вскрытие не проводят, а труп уничтожают путем сжигания.

**Диагностика.** Диагноз на эмфизематозный карбункул ставят комплексно с учетом эпизоотологических данных, не-благополучия местности, клинических признаков, характерных патологоанатомических изменений. Лабораторная диагностика складывается из бактериологического исследования биологического материала, проводимого в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Идентификация и дифференциация происходит путем изучения культуральных, морфологических и биохимических особенностей культур [16]. В настоящее время идентификация в значительной мере облегчена использованием диагностических тест-систем и ПЦР-диагностики [28].

Особое значение при подтверждении диагноза имеет постановка биопсии на морских свинках, которые должны погибнуть с характерными клиническими признаками в течение 24–72 часов после введения суспензии материала. Характерным патологоанатомическим признаком является серозно-геморрагический выпот на коже в месте поражения, при этом кожа с трудом отделяется от измененных мышц. Мышцы на груди и брюшного пресса влажные, темно-красного, почти черного цвета. Несмотря на ярко выраженные поражения мышц, кишечник остается без изменений.

Для диагностических исследований при подозрении на эмфизематозный карбункул в лабораторию направляют свежие трупы целиком. От крупных животных для исследования отбирают кусочки тканей и паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка), сердце с

перевязанными сосудами; мышцы, взятые на границе здоровой и пораженной ткани, целую трубчатую кость.

Каждую пробу материала отдельно помещают в стерильные одноразовые контейнеры или стеклянную посуду, не допуская загрязнения их наружной поверхности. Учитывая высокую чувствительность клоstrидии к кислороду, пробы материала отправляют в лабораторию немедленно после получения с целью сохранения жизнеспособности возбудителей и предотвращения избыточного роста сопутствующей микрофлоры.

Пробы транспортируют и хранят до начала исследования в холодильнике при температуре 2–8°C. При использовании для транспортирования в лабораторию проб материала пробирок с транспортировочной средой Аймса, обеспечивающей жизнеспособность бактерий в течение 72 ч., допускается хранение при температуре 18–20°C. В случае невозможности отправки материала в лабораторию сразу после взятия его однократно замораживают, а затем транспортируют и хранят при температуре минус 18°C и ниже.

Для пересылки жидкого материала (тканевой экссудат, кровь, моча) можно использовать шприцы. После наполнения шприца из него удаляют остатки воздуха, закрыв иглу стерильным ватным тампоном. Иглу дезинфицируют 70%-ным этиловым спиртом. Для герметизации конец иглы вкалывают в стерильную резиновую пробку и в таком виде шприц с материалом доставляют в лабораторию. При сборе большого объема материала (3 мл и более) анаэробные бактерии могут оставаться жизнеспособными в течение 24 ч. при комнатной температуре (18–20°C).

Одним из критериев предварительной диагностики клостродиозов животных является обнаружение возбудителя в мазках, приготовленных из проб

патологического материала. Мазки из крови, мочи и экссудата делают путем нанесения капли материала на стекло с последующим равномерным распределением по его поверхности. Для микроскопии мазков из органов и тканей готовят мазки-отпечатки. Для этого кусочек образца ткани, взятый по возможности из глубины исследуемого материала, разрезают пополам и свежим срезом несколько раз прислоняют к поверхности предметного стекла. Целесообразно готовить мазки-отпечатки, используя вторую часть образца материала, оставшуюся при посеве отпечатками на агаризированные среды.

Мазки подсушивают, фиксируют в спиртовой смеси или над пламенем горелки и окрашивают по Граму. Присутствие грамположительных палочек и спор позволяет предположить наличие возбудителей клостродиозов.

Материал, переданный на исследование в пробирках с транспортировочными средами, для приготовления мазков не используют в связи с высоким риском контаминации посторонней микрофлорой, либо мазки готовят после посева материала на питательные среды.

**Посев материала на питательные среды.** Для выделения из материала *Clostridium chauvoei* проводят посев образцов жидкого и плотного материала на питательные среды. Для посева используют свежеприготовленные жидкие питательные среды либо активируют их перед посевом путем прогревания пробирок и флаконов в кипящей водяной бане в течение 15–20 мин. для удаления растворенного в ней кислорода, а затем быстро охлаждают в холодной воде. Плотный материал (кусочки органов и тканей) высевают на среды методом мазков-отпечатков, либо предварительно готовят суспензии.

Культивирование посевов проводят в анаэробистате с температурным режимом 37°C в течение 24–48 часов. Для созда-

ния анаэробных условий используют специальные газогенераторные пакеты либо откачивают воздух с помощью вакуумного насоса, учитывая, что для культивирования различных видов требуется определённый уровень разрежения.

**Биологический метод выделения.** Одновременно с посевом часть приготовленной суспензии патологического материала используют для заражения восприимчивых животных, как правило, морских свинок. Заражение двух морских свинок производится подкожно в области брюшных мышц или внутримышечно в объёме 0,5 и 1,0 см<sup>3</sup>. Целесообразно одну морскую свинку заражать материалом с добавлением в суспензию равного объема 10% раствора хлористого кальция в дозе, так как некоторые виды клостридий не могут вызвать заболевание и гибель животных без наличия очагов воспаления в организме.

Наблюдение за животными продолжается в течение 72–96 часов. В случаях гибели животных проводят посев из крови сердца, а также печени на МППБ и кровяной агар методом посева-отпечатка с целью выделения чистой культуры возбудителя.

Метод позволяет очистить патологический материал путем пассажа через морскую свинку от посторонней непатогенной микрофлоры.

Дополнительно готовят мазки-отпечатки с мест посева и диафрагмальной поверхности печени, что позволяет дифференцировать отдельные виды клостридий: например, в мазках с диафрагмальной поверхности печени *Cl. chauvoei* находится в виде единичных или парных клеток, а *Cl. septicum* — в виде цепочек и нитей.

При наличии чистой культуры микрорганизма, что подтверждается обнаружением в мазках однородных клеток и типичными колониями на агаре, проводят изучение его биохимических свойств

для идентификации вида и типа возбудителя. Культуры клостридий 24–48 ч. роста со среды Китта–Тароцци или суспензии клеток, смытых с агара, засевают в пробирки с желатином, мясо-пептонным бульоном, лакмусовым молоком, с набором полужидких питательных сред с добавлением углеводов или многоатомных спиртов и культивируют в анаэробной стате. Результаты исследования оценивают ежедневно в течение 10 сут.

**Лечение** при эмфизематозном карбункуле, как и любой другой анаэробной инфекции, в первую очередь стоит рассматривать с экономической точки зрения. Даже в случае выздоровления из-за обширных поражений тканей и последующей потери животным продуктивности лечение часто нецелесообразно. К тому же большое животное выделяет огромное количество возбудителя в окружающую среду, что представляет потенциальную опасность для заражения других животных и человека. Поэтому во многих случаях целесообразно провести вынужденный убой с последующей утилизацией трупа и полной дезинфекцией помещения.

При высокой ценности животного, в случаях, если заболевание только начинается и нет выраженного поражения тканей, может быть начато лечение. При проведении терапевтических мероприятий учитывают биологические особенности анаэробов, патогенез и форму проявления болезни. В таком случае создаются неблагоприятные условия для возбудителей, предупреждаются нервно-дистрофические и гангренозные процессы и стимулируются защитные силы организма.

Большое значение имеет хирургическое лечение. Животных с признаками анаэробной инфекции изолируют, все лечебные процедуры проводят в отдельном помещении, не связанном со стационаром, перевязочной или другими по-

мешениями, где содержатся или лечатся другие животные. Перед операцией проводят обезболивание с использованием новокаиновых блокад. При вскрытии участков поражения максимально иссекают омертвевшие ткани и не допускают образования карманов. Ткани в зоне гангренозного поражения рассекают широким (лампасным) одним или несколькими разрезами в пределах отека, до границы признаков кровоточивости. До, во время и непосредственно после иссечения раны длительно промывают (до 20 мин.) горячими (~40°C) гипертоническими растворами солей с перекисью водорода, перманганатом калия или хлорамином. Промытые раны рыхло дренируют с применением дезинфицирующих бактерицидных средств либо обильно припудривают антибиотиками.

Резиновую обувь, перчатки, хирургическое белье, инструментарий тщательно моют и стерилизуют. Помещения и оборудование, где обрабатывают и содержат животных, дезинфицируют. Перевязочный материал, веревки, загрязненные экссудатом, сжигают.

Выраженным лечебным эффектом также обладает оксигенотерапия, при которой в зону анаэробного очага и пограничные здоровые ткани через иглу нагнетают кислород из кислородной подушки.

Конечно же, лечение анаэробной инфекции невозможно без применения различных антибиотиков. Для купирования причин заболевания и лечебных мероприятий целесообразно использовать комплексные антимикробные препараты в увеличенных дозах, при этом их вводят как для системного действия, так и обильно обкалывают ткани вокруг очага поражения.

Неспецифическое лечение заключается в использовании средств и методов, облегчающих течение болезни. Для обезболивания применяют ново-

каино-антибиотиковые блокады, интоксикацию снимают выведением различных растворов, например 40%-ного гексаметилентетрамина и кофеина, 10% раствора кальция хлорида с 20%-ным раствором глюкозы, 10% реополиглюкина и др.

Специфические лечебные сыворотки для лечения и профилактики эмфизематозного карбункула не выпускаются.

**Специфическая профилактика клостиридиозов.** В связи с широким распространением возбудителя в окружающей среде, острым или сверхострым течением болезни, тяжестью поражения тканей организма, лечение животных почти в 100% случаев неэффективно. Основным способом предотвращения эмфизематозного карбункула, как и других клостиридиозов, является специфическая профилактика.

Эффективность вакцин зависит от многих факторов, таких как количество и качество антигена, адьюванта, иммуностимуляторов, технологии изготовления препарата, схемы его применения. Важную роль играет и иммунный статус организма животного.

Вакцинацию животных против эмфизематозного карбункула впервые предложили французские исследователи Карневен, Арлуэн и Томас в 1882 г. В качестве вакцинного материала они использовали порошок из высущенных и растертых мышц больного животного, разведенный стерильной водой 1:2, который вводили двукратно с интервалом 10–12 дней. Для ослабления вирулентности материал прогревали в течение 7 часов при 95–100°C. Эти опыты, однако, не давали ожидаемого эффекта, так как при нагревании разрушались антигены возбудителя, обладающие иммуногенными свойствами. В последующем многие исследователи сообщали о создании какmono-, так и ассоциированных препаратов против

клостридиозов крупного рогатого скота и овец, при этом наличие компонента *Cl. chauvoei* в вакцинах было неизменным. Начиная с 30-х годов прошлого века в разных странах практически одновременно были изготовлены и стали активно применяться вакцины против эмфизематозного карбункула, изготовленные из культур, инактивированных формалином.

В СССР проблема борьбы с эмфизематозным карбункулом стояла чрезвычайно остро, поэтому вакцина против него была одним из первых препаратов, созданных в стране. Автором препарата являлся С.Н. Муромцев, предложивший его в 1931 г. Производство и внедрение в практику позволило уйти от ранее применяемых для иммунизации так называемых «блеклегоидов», представляющих собой болюсы, спрессованные из порошка поражённых эмкаром мышц, обработанных при 97°C в течение 5–6 часов. Такой способ профилактики был разработан в Италии в 1908 г. исследователем Kitt, и до 1918 г. «блеклегоиды» ввозились в Россию из-за границы, а после стали изготавливаться на Донской, Днепропетровской и Воронежской биофабриках.

Вакцина, предложенная Муромцевым, представляла собой культуру высоковирулентного штамма *Cl. chauvoei*, выращенную в питательной среде и инактивированную формалином, что делало ее полностью безопасной для животных и достаточно эффективной. Препарат содержит в одной иммунизирующей дозе не менее 10 млрд м.к. штамма *Cl. chauvoei R<sub>15</sub>*, инактивированных формалином и адсорбированных на гидроокиси алюминия в качестве адьюванта. Еще одним препаратом является живая ассоциированная вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула, изготавливающаяся из аттенуированных штаммов возбудителей.

Каждый из названных препаратов имеет свое преимущество, из которых наиболее удобным является однократное введение, что позволяет индуцировать иммунитет на 6 мес. (от инактивированной вакцины) и 12 мес. (при применении живой вакцины).

В настоящее время в Российской Федерации разработаны еще две ассоциированные вакцины против клостридиозов, в том числе эмфизематозного карбункула. Это вакцины «КЛОСТБОВАК-8» и «Антокс-9». Также существует целый ряд зарубежных аналогов. Вакцинации от клостридиозов подвергается весь высокопродуктивный скот как молочных, так и мясных пород. Учитывая столь широкий спектр препаратов, имеющих разнообразный состав антигенов, производители пользуются теми из них, которые наиболее актуальны в конкретной местности.

## Литература

- Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам. Сибирский вестник с.-х. науки. 2017; 47(1): 90–96.
- ГОСТ 26503-85. Методы лабораторной диагностики клостридиозов. М., 1985; 16.
- Грязнова Д.В. Разработка комплексных препаратов для профилактики и диагностики газовой гангрены. Дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 1999; 120.
- Каган Ф.И., Никифорова Н.М., Колесова А.И. Производственное испытание концентрат-вакцины против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота. Труды ГНКИ. 1964; 245–248.
- Каган Ф.И. Специфическая профилактика и терапия анаэробных ин-

- фекций. Дис. ... д-ра вет. наук. М., 1964; 326.
6. Каган Ф.И. Ассоциированная иммунизация животных. Сельскохозяйственная биология. 1966; 1: 491–496.
  7. Каган Ф.И., Коваленко Я.Р. Опыт одновременной вакцинации против эмфизематозного карбункула и сибирской язвы. Советская ветеринария. 1932; 23–24: 17–20.
  8. Каган Ф.И., Никифорова Н.М., Колесова А.И. Производственное испытание концентрат-вакцины против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота. Труды ГНКИ. 1966; 13: 18–22.
  9. Капустин А.В., Алипер Т.И. Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота. Материалы межд. вет. конгресса. 2017; 106–108.
  10. Капустин А.В., Скляров О.Д., Лайшевцев А.И. Эффективность применения вакцины «Клостбовак-8» против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами *Clostridium* spp. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016; 9: 6–11.
  11. Капустин А.В., Гlushenkova Ю.А. Определение концентрации и кратности введения компонента *C. chauvoei* при разработке ассоциированных вакцин. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов АПК, материалы научно-практической конференции, посвященной 95-летию Армавирской биофабрики. 2016; 229–234.
  12. Капустин А.В. Разработка вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 5(53): 97–102.
  13. Мардер В., Капустин А.В., Щербаков П., Шилова Е. Проблема клостридиозов в молочном животноводстве. БИО. 2016; 5(188): 34–38.
  14. Капустин А.В., Моторыгин А.В., Букова Н.К. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота. Вестник ветеринарии. 2013; 1(64): 71–73.
  15. Кириллов Л.В. Стандартизация вакцин, анатоксинов и антитоксических сывороток, применяемых для специфической профилактики клостридиозов. Дис. ... д-ра вет. наук. М., 1984; 305.
  16. Коваленко Я.Р. Анаэробные инфекции сельскохозяйственных животных. М., 1954; 338.
  17. Маянский А.Н. Микробиология для врачей. Клостридии. Нижний Новгород. 1999; 139–152.
  18. Панин А.Н., Татаринцев Н.Т. Основные требования к производственным и контрольным штаммам микроорганизмов. Ветеринария. 1993; 4: 28–29.
  19. Первова Л.М. Разработка и испытание ассоциированной вакцины против эмфизематозного карбункула и лептоспироза крупного рогатого скота. Дис. ... канд. вет. наук. М., 1988; 135.
  20. Плесских С.А. Разработка и испытание живой ассоциированной вакцины против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота. Дис. ... канд. вет. наук. М., 1992; 131.
  21. Радионова К.П., Карабанова О.В. Клостридиозы сельскохозяйственных животных. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2010; 9: 12–14.
  22. Редкозубова Л.И. Контроль клостридий — систематическая вакцинация. Ветеринария. 2016; 1: 9–12.
  23. Сторожев Л.И. Сравнительное изучение живых и убитых вакцин против эмфизематозного карбункула. Дис. ... канд. вет. наук. 1977; 168.
  24. Терентьева Т.Е., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на

- молочных комплексах. Российский вет. журнал. 2016; 1: 5–9.
25. Ургуев К.Р. Клостридиозы животных. Россельхозиздат. М., 1987; 183.
  26. Шатико П.Д. Роль слепней как переносчиков эмфизематозного карбункула КРС. Ветеринария. 1952; 7: 76–79.
  27. Frey J. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. Vaccine. 2012; 30: 5500–5505.
  28. Kuhnert P., Krampe M., Capaul S.E., Frey J., Nicolet J. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. Vet. Microbiol. 1997; 57: 291–298.
  29. Giraudo Conesa L.C., Vannelli S.A., Uzal F.A. Detection of *Clostridium chauvoei* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique. Vet. Res. Commun. 1995; 19: 451–456.
  30. Prescott J.F., McVey D.S. Clostridial infections. Veterinary Microbiology. 3<sup>rd</sup> edition. 245.
  31. Songer J.G., Rood J.L., McClane B.A., Titball R.W. Molecular and immunological methods for the diagnosis of clostridial diseases. In: The clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press. Inc. USA. 1997; 491–503.
  32. Songer JG. Clostridial diseases of small ruminants. Vet. Res. 1998; 29: 219–232.
  33. Titball R., Mainil J., Duchesnes C., Popoff M. Protein toxins of the genus Clostridium and vaccination. Scientific booklet of the CA QLK2-CT2001-01267. Presses Fac. Méd. Vét. ULg. Liège. Belgium. 2003; 89–99.
  34. Wiegel J. Family I. Clostridiaceae. In: De Vos P. et al. (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Science. New York. 736.

# ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЙ ОТЕК

Капустин А.В., Моторыгин А.В.

**Введение.** Злокачественный отек — острая раневая инфекция, характеризующаяся быстро наступающим омертвением пораженной ткани с образованием газов и интоксикацией организма. Чаще всего злокачественный отек у животных встречается при массовых хирургических операциях (обрезка хвостов, рогов, кастрация), а также тяжелых отёлах. В зависимости от этого находится и локализация инфекционного процесса: матка в послеродовой период, голова, мошонка; достаточно часто может возникнуть поражение сычуга и тонкого отдела кишечника. Практически в 100% случаев болезнь заканчивается гибелью либо вынужденным убоем животного. Инфекции носят стационарный характер и характеризуются высокой летальностью, что приводит к значительному экономическому ущербу для хозяйств [12, 14, 40, 45].

**Этиология.** Нельзя выделить какой-либо отдельный вид возбудителя, являющийся основным этиологическим фактором злокачественного отека: как правило, они находятся в ассоциации и представлены следующими видами: *C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*. Также в ряде случаев выделяются непатогенные клостридии, образующие протеолитические ферменты и в значительной степени осложняющие течение болезни и вызывающие гнилостный распад тканей. Заболевание, обусловленное смешанной инфекцией, клинически протекает тяжелее, быстрее и, как правило, заканчивается летально [2, 4, 11, 45].

Термин «клострдиозы», получивший наименование от рода микроорганизмов — *Clostridium*, объединяет все болез-

ни теплокровных животных, вызываемые различными видами анаэробных спорообразующих бактерий. Помимо спорообразования и чувствительности к кислороду, эти виды объединяет способность образовывать специфические высокоактивные токсины, оказывающие летальное действие на макроорганизм, из-за чего их часто в литературе именуют токсико-инфекциями [12, 29]. В настоящее время насчитывается около 220 видов клостридий, большинство из которых сапрофиты. Количество патогенных видов клостридий относительно невелико, причем некоторые из них не могут самостоятельно вызывать заболевания, но, находясь в ассоциации с другими анаэробными и факультативно анаэробными бактериями, сильно осложняют инфекционный процесс и затрудняют диагностику [11, 20, 28, 43].

Клостридии относится к роду *Clostridium*, семейству *Clostridiaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, отделу *Firmicutes*. Согласно классификации Бердже, род разделен на пять групп, сформированных по способности видов ферментировать желатин и расположению спор в клетке (центрально, терминально или субтерминально) [6]. Основной биологической особенностью патогенных клостридий является способность продуцировать высокоактивные токсины, которые при воздействии на определенные ткани и органы макроорганизма нарушают их нормальное функционирование, обуславливая развитие специфических, опасных для жизни патологических состояний [1, 11, 16].

В настоящее время в РФ клострдиозы у рогатого скота регистрируются ежегодно, при этом носят спорадиче-

ский характер и проявляются в виде заболевания небольшого количества животных. Фактически в каждом не-благополучном по эмфизематозному карбункулу пункте выявляют 3–5 голов больных животных; 2–4 — по злокачественному отеку и 6–15 — по анаэробной энтеротоксемии.

Следует учитывать, что официальные данные не совсем отражают реальную ситуацию с заболеваемостью животных анаэробными инфекциями, так как обращение владельцев в государственную ветеринарную службу в случае подтверждения анаэробной инфекции влечет за собой наложение ограничительных мероприятий и существенные экономические потери. Поэтому владельцы предпочитают проводить диагностику в многочисленных коммерческих диагностических центрах и принимают решение о применении средств специфической профилактики в зависимости от спектра идентифицированных видов клоstrидий либо вовсе замалчивают случаи гибели

животных. Несмотря на опасность, эти болезни считаются незаразными, и возникновение отдельных случаев при соблюдении мер безопасности, дезинфекции и профилактике болезни не ведет к массовому распространению инфекций.

Как видно из рис. 1, при бактериологическом исследовании патологического материала от КРС выделяются *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tertium*. Наиболее клинически значимыми являются виды *C. septicum* — обнаруживается в 34,5% случаев, *C. perfringens* тип А — 23,25%, *C. perfringens* тип С — 14,25%, *C. perfringens* тип D — 6,5%, *C. oedematiens* — 2,5%, *C. sordellii* — 6,5%. Все остальные виды (*C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*) встречаются в пределах 1–2%.



Рис. 1. Структура клоstrидиозов крупного рогатого скота, вызванных наиболее клинически значимыми видами клоstrидий

Полученные результаты в определенной степени подтверждают литературные данные о важном значении в возникновении клостридиозов у взрослого КРС таких возбудителей, как *C. septicum*, ранее считавшейся более актуальной для овец, *C. perfringens* различных типов, особенно типа А, являющихся причиной болезни в 44,0% случаев, *C. oedematiens*, *C. sordellii*, *C. chauvoei*. Следует отметить, что эта структура свойственна злокачественным отекам у взрослого КРС; у телят складывается несколько другая картина заболевания.

Анализ данных, приведенных на рис. 1, позволяет утверждать о наличии широкого спектра возбудителей анаэробных болезней крупного рогатого скота, как описанных ранее, так и не упоминавшихся в роли этиологических агентов.

Клостридиозы у коров наблюдали в большинстве случаев сразу после отела, реже после травм с открытыми раневыми поверхностями. Клинически у коров болезнь начиналась с быстро нарастающего угнетения, вызванного интоксикацией организма, отеками, омертвением пораженных тканей. Как правило, поражаются мышцы тазовых конечностей, органы репродуктивной системы, вымя, реже другие органы и ткани.

Следует отметить, что независимо от вида возбудителя, вызывающего патологию, клостридиозы у КРС всегда протекали остро, вызывая видимые поражения тканей уже через несколько часов после выявления у животного признаков болезни, и заканчивались летальным исходом практически в 100% случаев.

## Характеристика основных возбудителей злокачественного отека

***Clostridium perfringens*.** Бактерии данного вида представляют собой крупные

толстые палочки размером  $1,0\text{--}1,5 \times 4,0\text{--}8,0$  мкм, расположенные изолированно или парами, реже короткими цепочками, неподвижные. Молодые культуры окрашиваются по Граму положительно, старые — отрицательно, образуют овальные или сферические споры, облигатные анаэробы, каталазоотрицательные. Являются возбудителями инфекционной анаэробной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии, а также достаточно часто выделяются в ассоциации с другой микрофлорой при злокачественных отеках у животных различных видов и газовой гангрене у человека.

Культуры хорошо растут на питательных средах при наличии невысокого уровня анаэробиоза (40 мм. рт. ст.), при этом на поверхности агара образуют несколько вариантов колоний, как правило, гладкие, шероховатые или слизистые.

При росте на жидкых питательных средах (МППБ, Китта—Тароцци и др.) вызывают интенсивное помутнение среды с обильным газообразованием. После окончания роста происходит выпадение культуры в осадок с полным просветлением среды. Обладая высокой ферментативной активностью, образуют кислоту и газ из глюкозы, фруктозы, галактозы, мальтозы, лактозы, крахмала, гликогена и инозита. Встречаются штаммы, ферментирующие салицин. Лактусовое молоко при посеве достаточно большой дозы возбудителя свертывается быстро с образованием кислоты, сгусток не переваривается. Индол не образуют, свернутую сыворотку крови и альбумин не разжижают, в мозговой среде не вызывают покернения, в бульоне с кусочком мяса происходит окраска мяса в красный цвет. Желатин в процессе роста разжижают и вызывают его потемнение.

Культуры хорошо растут при температуре 35–37°C, но могут расти и при 42°C, что является дифференцирующим экспресс-тестом. При посеве на МППБ

или лакмусовое молоко при 42°C рост и газообразование наблюдаются уже через 3 ч., так как другие клоstrидии вырастают только через 8–16 часов и более.

По спектру продуцируемых токсинов вид *C. perfringens* разделен на пять типов: А, В, С (F), D, Е, патогенные свойства которых различны. Так, *C. perfringens* тип А вызывает пищевые отравления у человека и животных, газовую гангрену, в том числе некротизирующие энтериты и маститы у КРС, энтериты у собак, некротизирующий энтерит у кур. *C. perfringens* тип В является возбудителем дизентерии ягнят и жеребят, энтеротоксемии молодняка различных видов животных. *C. perfringens* тип С вызывает геморрагическую энтеротоксемию у овец и поросят, телят, жеребят; некротический энтерит у цыплят; *C. perfringens* тип D — энтеротоксемию овец («мягкая почка»), коз, телят; *C. perfringens* тип Е — энтеротоксемию овец и телят. Существовавший ранее тип F после внедрения в практику генетических исследований был реклассифицирован и отнесен к типу С.

Высокая ферментативная активность, быстрый рост и интенсивное газообразование при росте на плотных питательных средах вызывают разрывы агара. Таков же патогенез инфекции и в тканях организма-хозяина: интенсивное газообразование создает очаг повышенного давления, сдавливаются кровеносные сосуды, без поступления крови происходит омертвление тканей и быстрый рост культуры клоstrидий. Образующиеся токсины впитываются из очага некроза и разносятся по организму, вызывая нарастание общего токсикоза и коматозное состояние. Токсины, продуцируемые клоstrидиями, имеют в основном белковую структуру, и изучению их антигенной структуры посвящено большое количество работ [1, 11, 26, 34, 54].

Следует учитывать, что под общим термином «токсин *C. perfringens*» подразу-

мевается наличие не менее 12 токсинов и агрессинов, наиболее значимыми из которых являются альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ) и йота ( $\iota$ ) токсины (табл. 1). Все они обладают выраженной токсичностью, гемолитической активностью, дерматонекротизирующими и лецитиназным действием, что при комплексном воздействии приводит к быстрому летальному эффекту [20, 32, 44, 52].

*Clostridium septicum* — возбудитель злокачественного отека животных различных видов, а также брадзота и брадзотоподобных болезней. Микроорганизм патогенен и для человека, являясь одним из самых распространённых возбудителей газовой гангрены.

*C. septicum* впервые был выделен Л. Пастером в 1874 г. из трупа животного, павшего с признаками, характерными для сибирской язвы. В последующих работах Р. Кохом было подтверждено это открытие, а Орлуэном в 1892 г. выделена чистая культура микроорганизма [11, 21, 41].

Бактерии представляют собой подвижные длинные палочки с закругленными концами размером  $0,6\text{--}2,0 \times 2\text{--}35$  мкм, окрашивающиеся грамположительно в молодых и грамотрицательно в старых культурах. Образуют споры овальной формы, расположенные субтерминально или центрально.

Микроб хорошо растет на питательных средах. На кровяном агаре образует нежные вуалеобразные колонии с выростами, окруженные гемолизом. На жидких питательных средах растет с интенсивным помутнением и газообразованием. Сбраживает с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, салицин, мальтозу. Галактозу и сахарозу не ферментирует. Желатин разжижает медленно. Кусочки мяса в МПБ краснеют. Мозговой бульон не чернеет [21].

*C. septicum* вырабатывает высокоактивные токсины, основным из которых

является  $\alpha$ -токсин, обладающий летальными и некротическими свойствами,  $\beta$ -токсин (ДНК-за) и  $\mu$ -токсин (гиперонидаза). Гиперонидаза вырабатывается у *C. septicum* в больших количествах, при этом чем токсичнее штамм, тем в больших количествах он продуцирует гиперонидазу [26, 41].

Злокачественные отеки, вызванные *C. septicum*, возникают спорадически и связаны с поеданием загрязненных кормов и плохим санитарным состоянием мест содержания животных. Болезнь почти всегда протекает остро, хотя возможны и хронические случаи. При попадании в рану через несколько часов в этой области образуется отек и эритема с резко выраженной болезненностью. При прогрессировании болезни отек быстро увеличивается, распространяясь на подкожную клетчатку, помимо отека при пальпации четко ощущается крепитация тканей. Кожа тугая и диффузно красная или почти черная. Почти всегда присутствуют угнетение, тахикардия, повышение температуры и судороги. На более поздних стадиях заболевания пораженный участок становится холодным, боль исчезает из-за некроза локальных нервных окончаний и субнормальной температуры. В большинстве случаев смерть происходит от токсемии и системного шока в течение 2–4 дней после появления клинических признаков.

У коров злокачественный отек часто связан с тяжелыми отелями и проявляется в форме некротизирующего вульвовагинита, метрита, мастита. Болезнь развивается обычно через 1–3 дня после отела, проявляется отеком вульвы, промежности и сопровождается гипертермией и угнетением. Начавшийся процесс практически в 100% случаев заканчивается гибелью животного [39, 55, 27].

Патологические изменения характеризуются серьезными системными изменениями и быстрым распространением инфекции по организму. Наблюдают диффузный геморрагический студенистый подкожный отек и эмфизему. Если затронуты мышцы, то отмечают четко выраженное изменение окраски тканей, отдельные области при этом могут быть темно-красными, а рядом расположенные — серого или синеватого цвета, иметь вид вареного мяса. Также присутствуют серозные и субэндокардиальные кровоизлияния, увеличение селезенки, печени, отек легких как следствие тяжелой интоксикации [14, 36].

При хронических формах инфекции, вызванной *C. septicum*, у крупного рогатого скота развивается так называемый целлюлит, когда происходит локальное повреждение крупных скелетных мышц, которые потом инкапсулируются. Такие изменения происходят при заражении животных нетоксичными штаммами возбудителя или при развитии инфекции у вакцинированного поголовья. При хроническом течении болезни продолжительность процесса может составлять до 30 дней, но также заканчивается летальным исходом [6].

*Clostridium oedematiens (novyi)* широко распространена в природе и по частоте выделения уступает лишь *C. perfringens* тип А [6]. Бактерии этого вида патогенны для человека, всех млекопитающих и птиц. Учитывая высокую токсичность *C. oedematiens*, летальность при заболевании газовой гангреной, осложненной этим видом, составляет не менее 50% [12, 17].

*C. oedematiens* представляет собой полиморфную палочку с закругленными концами, длиной 1,6–17 мкм, шириной 0,6–1,4 мкм. Располагается одиночно, парами и/или цепочками. Подвижная, имеет до 20 расположенных перитрихиально жгутиков. Образует крупные

овальные споры, расположенные центрально или субтерминально, которые появляются через 24–48 ч. роста, реже через 2–8 суток.

Возбудитель впервые был выделен Нови в 1894 г. из трупов морских свинок, павших с признаками злокачественного отека. В 1915 г. М. Вайнберг и Р. Сеген выделили этот микроб при газовой гангрене у человека, сопровождающейся сильной интоксикацией. Ими было присвоено микроорганизму название *Bacillus oedematiens*. В 1934 г. исследователями Скоттом, Трнером и Вовтром было предложено разделить вид на четыре типа в зависимости от источника происхождения, патогенности и ферментации глицерина [32, 46].

При росте в жидких питательных средах *C. oedematiens* образует диффузное помутнение с последующим просветлением среды и выпадением осадка. На агаре образует колонии различной формы, от двояковыпуклых с перистыми краями до колоний в виде сплетения тонких нитевидных отростков. Культуры гемолитичны, ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу и фруктозу, непостоянно — глицерин, мальтозу; не ферментируют лактозу, сахарозу, маннит, салицин; редуцируют нитраты в нитриты.

Все типы *C. oedematiens* способны продуцировать растворимые токсины и ферменты. Первые два типа, часто участвующие в развитии злокачественного отека, образуют летальный и некротический  $\alpha$ -токсин, который является сильнодействующим ядом, нарушающим проницаемость стенок сосудов, что ведет к экссудации жидкости и белка в ткани. Некоторые штаммы типа В образуют до 100 тыс. Dlm/мл токсина. Токсины  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  в значительной мере усиливают действие основного токсина,  $\varepsilon$ -токсин (лизаза) — летальный и гемолитический;  $\gamma$ -токсин (лецитина-

за) — некротический и гемолитический;  $\zeta$ -токсин (кислородо-лабильный гемолизин) имеет гемолитическое действие [20].

В зависимости от вида образуемого токсина было выделено четыре типа *C. oedematiens*, первый из которых — *C. oedematiens (noyui)* тип А является наиболее часто встречающимся возбудителем газовой гангрены у человека и злокачественных отёков у различных видов животных [13, 16].

*C. noyui* тип А является основным возбудителем гангренозного поражения тканей у человека и животных, *C. noyui* тип В является возбудителем некротического гепатита у овец, реже крупного рогатого скота. Также он имеет еще одно наименование — *C. gigas*. *C. noyui* тип С считается непатогенным видом клостридий, хотя впервые был выделен при хроническом остеомиелите буйволов; четвертый тип *C. noyui* — тип D — возбудитель бациллярной гемоглобинурии КРС.

Зарождаются в основном взрослые животные, обычно в хорошем упитанном состоянии, молодняк поражается редко. Риск развития заболевания присутствует всегда, но одним из обязательных условий возникновения болезни является наличие поражения печени, вызываемого гельминтами, обычно фасциолами, а причиной гибели животных является острая неспецифическая токсемия [12, 37].

Болезнь проявляется остро, животные погибают в течение нескольких часов после начала заболевания, часто без клинических признаков, либо они неспецифичны: слабость, нежелание двигаться, сонливость, анорексия, гипертермия, тахипноэ, тахикардия. Возможны слабая желтушность и гемоглобинурия. У крупного рогатого скота признаки заболевания схожи с таковыми у овец, кроме этого, могут присут-

ствовать геморрагическое воспаление кишечника, запоры, кровь в фекалиях.

Характерным признаком является наличие в печени ишемических инфарктов — более светлых участков по сравнению с окружающими тканями и с пятнами голубовато-красных тромбозов. Некрозы небольшие, но множественные. Туши животных быстро разлагаются, при этом выражены геморрагические отеки подкожной клетчатки и скопление большого количества газов в брюшной полости.

*C. sordellii* представляет собой грам-положительные крупные спорообразующие палочки с закруглёнными концами  $0,5\text{--}1,7 \times 1,5\text{--}20$  мкм, располагающиеся изолированно, парно или в виде цепочек. Микроорганизм подвижен благодаря многочисленным жгутикам, не является строгим анаэробом. На поверхности питательных сред через 24–48 часов роста образуются серовато-белые шероховатые колонии с неровными зубчатыми краями. На кровяном агаре с лошадиной кровью формируются колонии в виде ромбов с узкой зоной бета-гемолиза. При культивировании на жидких питательных средах происходит интенсивный рост *C. sordellii* в течение 24 часов, сопровождающийся равномерным помутнением среды с образованием вязкого, мукоидного осадка и характерного острого гнилостного запаха; в старых бульонных культурах наблюдается образование осадка в виде мелких скоплений белых кристаллов тирозина [22, 35, 54].

Большинство штаммов *C. sordellii* ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу и фруктозу, не действуют на сахарозу, инулин, декстрин, гликоген, крахмал, дульцит, лактозу. Лактусовое молоко под действием *C. sordellii* сбраживается со слабым газообразованием. Бактерии разжижают свёрнутый

яичный белок, свёрнутую сыворотку крови лошади, желатин, переваривают кусочки мяса и казеина, вырабатывают сероводород и индол, не восстанавливают нитраты в нитриты.

*C. sordellii* нередко обнаруживают в ранах, чаще в ассоциации с другими анаэробными и аэробными микроорганизмами. Вирулентность выделенных штаммов *C. sordellii* для лабораторных животных обусловлена  $\beta$ -токсином, обладающим высокой биологической активностью и специфичностью. Токсин *C. sordellii* впервые был получен Сорделли в 1922 году из культуральной жидкости штамма, выращенного на мясном бульоне с добавлением пептона при pH 8,0. При введении морским свинкам в дозе 0,01 мл растущей культуры токсин вызывал гибель животных через сутки и ненейтрализовался сыворотками других возбудителей газовой гангрены (*C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. histolyticum*). Оптимальной средой для накопления токсина является питательный бульон из кислотного гидролизата казеина, содержащий 140–160 мг% аминного азота с добавлением 0,5% глюкозы [6, 22, 35].

*C. sordellii* часто выделяют при болезнях, симптомы которых характерны для других клоstrидиозов. Например, при внезапной смерти у овец всех возрастов, остром абомазите у телят и ягнят, геморрагическом энтерите, гангренозном поражении органов репродуктивного тракта новорожденных коров. Абомазиты у подсосных телят, вызванные *C. sordellii*, часто приводят к внезапной смерти. Часто возникновение болезни связано с отъемом молодняка от матерей, переходом на грубые корма, выгоном на пастбище, кормлением животных силосом [35].

Все возбудители клоstrидиозов обладают общей для спорообразующих бактерий устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды и могут

годами сохраняются в почве, а при благоприятных температурных условиях и влажности даже размножаются в ней. Споры выдерживают кипячение в течение нескольких минут. Также стоит упомянуть, что, согласно современной классификации, данный вид исключен из рода *Clostridium* и носит название *Paeniclostridium sordellii*.

**Патогенез.** Различают инфекционную и токсическую стадии развития болезни. В инфекционной стадии происходит усиленное размножение бактерий в очаге поражения, что влечет образование отека и газовую инфильтрацию пораженных тканей, а затем быстрое распространение их по организму с кровью. Токсическая стадия развивается в результате действия токсинов, приводящих в итоге к гибели организма. Поражения чаще наблюдаются на участках тела с массивной мускулатурой — круп, бедро, лопатка, спина, голова, шея, голень.

Споры возбудителей болезни, попав в поврежденную ткань, при наличии анаэробных условий прорастают, интенсивно размножаются, выделяя токсины. Микрофлора, токсины и продукты распада тканей всасываются в кровь, разносятся по всему организму, осложняя патологический процесс. В результате интоксикации поражаются ЦНС, дыхательный центр, нарушается сердечная деятельность и наступает смерть от интоксикации.

**Клинические признаки.** Клинические признаки заболевания разнообразны и зависят от локализации процесса, а также от вида возбудителя или их ассоциаций. Инкубационный период может занимать от нескольких часов до нескольких дней.

Как любому острому процессу, злокачественному отеку свойственна вначале высокая температура, угнетение на фоне интоксикации, нарушение работы сердца, учащение дыхания. Болезнь проявляется остро, отмечают болезненность,

цианоз слизистых, выраженное угнетение с анорексией. Диарея обычно не отмечается. Заболевание носит спорадический характер и проявляется внезапной гибелью отдельных животных.

При злокачественном отеке репродуктивных органов обнаруживают отеки, кровоизлияния на слизистой влагалища. Из матки выделяется зловонная темная жидкость. При распространении возбудителей по лимфатической системе могут быть поражены близлежащие участки мышечной ткани бедер, перомежность, вымя. Также могут обнаруживаться крепитирующие отеки под кожей груди, крестцовой области, брюшных мышц.

Характерным признаком присутствия возбудителя при злокачественном отеке является поражение мышечной ткани, подкожной клетчатки, подслизистого слоя. При участии в процессе *C. sordellii* и *C. novyi* развиваются с сильно выраженные студенистые отеки, имеющие желто-коричневую окраску.

**Патологоанатомические изменения.** При проведении патологоанатомического исследования трупов животных, павших с признаками клостридиозов, обнаруживали наличие экссудата в брюшной и грудной полостях, вздутие и геморрагическое воспаление слизистой тонкого отдела кишечника различной степени выраженности, у отдельных животных выявлялось поражение почек, сопровождающееся размягчением паренхимы органа. На серозных поверхностях внутренних органов, как правило, присутствовали точечные кровоизлияния. В зависимости от токсичности штаммов возбудителя и длительности течения болезни наблюдались сильно выраженные изменения печени и сердца.

Печень увеличена, глинистый цвет с четко выраженным очагами некрозов либо с полностью пораженной тканью. Желчный пузырь наполнен значитель-

ным количеством желчи. Изменения в сердце зависят от возбудителя инфекции, мышцы могут быть бледными, имеют вид вареного мяса или обильные кровоизлияния. Легкие отечны, трахея и бронхи в различной степени заполнены пенистой жидкостью, на слизистой полосчатые кровоизлияния.



Рис. 2. Поражение мышечной ткани, выделение пузырьков газа



Рис. 3. Очаги некроза мышечной ткани (так называемый «целлюлит») при поражении, вызванном *C. septicum*



Рис. 4. Кровоизлияния на сердце при анаэробной инфекции



Рис. 5. Желатинозный отек соединительной ткани с желтушной окраской, вызванный *C. sordellii*

Наиболее часто выявлялись случаи гангренозного поражения мышц бедренной группы, сопровождающиеся образованием обширного отека, крепитацией ткани при надавливании, с последующим их расплавлением, наличием экс-судата, пузырьков газа, специфического запаха. У отдельных животных в мышцах обнаруживались ограниченные, покрытые капсулой участки ткани темно-красного или вишневого цвета, с маслообразной консистенцией, размером от 7 до 15 см в диаметре — так называемый «целлюлит», вызываемый *C. septicum* (рис. 3).

Также отмечают расширение съчуга, гиперемию сосудов, отек подслизистой оболочки, кровоизлияния и обширные некрозы слизистой с изъязвлением. У отдельных животных могут наблюдаться прободные язвы стенки съчуга. При этом мышечная ткань становится тусклой и рыхлой, с обширными кровоизлияниями. Во внутренних органах наблюдается интенсивная гиперемия и кровоизлияния в надпочечниках, почках, кишечнике [6].

**Диагностика клоstrидиозов.** Диагностiku клоstrидиозов проводят комплексно с учетом эпизоотических данных, не-благополучия местности, клинических признаков, характерных патологогана-

томических изменений и данных лабораторных исследований. Лабораторные исследования проводят на основании ГОСТ 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Для диагностических исследований при подозрении на клостридиозы в лабораторию направляют кусочки тканей и паренхиматозных органов, взятые на границе здоровой и пораженной ткани; целую трубчатую кость. В случае проведения прижизненной диагностики для исследования отбирают кровь, мочу, молоко, пунктат из пораженных тканей и лимфатических узлов; при поражении органов репродуктивной системы — содержимое матки или истечения из влагалища [7, 15, 16]. Учитывая высокую чувствительность большинства видов клостридий к кислороду, пробы материала отправляют в лабораторию немедленно после получения с целью сохранения жизнеспособности возбудителей и предотвращения избыточного роста сопутствующей микрофлоры.

Материал транспортируют и хранят до начала исследования в холодильнике при температуре 2–8°C. При использовании для транспортирования проб материала пробирок с транспортировочной средой, обеспечивающей жизнеспособность бактерий в течение 72 ч., допускается их хранение на среде Эймса при температуре 18–20°C. В случае невозможности отправки материала в лабораторию сразу после взятия допускается его однократное замораживание, транспортирование и хранение при температуре минус 18°C и ниже.

Все образцы жидкого патологического материала (кровь, моча, экссудат) высеваются на чашки Петри с плотными питательными средами, после чего равномерно распределяют по поверхности, используя бактериологическую петлю или шпатель; одновременно по 5–10 капель вносят в пробирки с жидкими

питательными средами (Китт–Тароцци, МППБ под вазелиновым маслом, лактусовое молоко) [20, 43]. Для посева используют свежеприготовленные жидкие питательные среды либо активируют их перед посевом путем прогревания пробирок и флаконов в кипящей водяной бане в течение 15–20 мин. для удаления растворенного в среде кислорода, а затем быстро охлаждают, добавляя холодную воду в водяную баню.

Плотный материал (кусочки органов и тканей) высеваются на среды методом мазков-отпечатков, либо предварительно готовят суспензии. В случае исследования образцов, поступивших в пробирках с транспортировочными средами Эймса, материал тампоном наносят только на одну четверть чашки Петри; дальнейший посев оставшихся трёх четвертей чашки производится по методу Дригальского либо используют несколько чашек со средой. В жидкую питательную среду его засевают путем погружения тампона с последующим культивированием для накопления, далее проводят пересев культуры на плотные питательные среды для изоляции бактерий.

Культивируют посевы в анаэроб状态下 с температурным режимом 37°C в течение 24–48 часов. Для создания анаэробных условий используют специальные газогенераторные пакеты либо откачивают воздух с помощью вакуумного насоса, учитывая, что для культивирования различных видов требуется определённый уровень разрежения. При культивировании чашек с посевами в анаэроб状态下 с газогенераторными пакетами их помещают в него крышками вниз, при культивировании в вакууме — крышками вверх [6, 20].

Одновременно с посевом часть приготовленной суспензии используют для заражения восприимчивых животных, как правило, морских свинок. Заражение двух морских свинок производится

подкожно в области брюшных мышц или внутримышечно в объёме 0,5–1,0 см<sup>3</sup>. Целесообразно одну морскую свинку заражать материалом с добавлением в суспензию равного объема 10% раствора хлористого кальция, так как некоторые виды клостридий не могут вызвать заболевание и гибель животных без наличия очагов воспаления в организме [20, 44, 48].

Наблюдение за животными продолжается в течение 72–96 часов. Обращают внимание на общее состояние, угнетенность, повышение температуры, наличие воспаления на месте инъекции [20, 39, 54].

В случаях гибели животных с выше перечисленными признаками проводят посев из крови сердца, а также печени на МППБ и кровяной агар методом посева-отпечатка с целью выделения чистой культуры возбудителя. Метод позволяет очистить патологический материал путем пассажа через морскую свинку от посторонней непатогенной микрофлоры.

Дополнительно готовят мазки-отпечатки с мест посева и диафрагмальной поверхности печени, что позволяет дифференцировать отдельные виды клостридий: например, в мазках с диафрагмальной поверхности печени *C. chauvoei* находится в виде единичных или парных клеток, а *C. septicum* — в виде цепочек и нитей.

Через 24–48 часов культивирования проводят пересев с жидких питательных сред на 3–5 чашки Петри с МППА, в которые добавляют 0,5% глюкозы и 5–10% стерильной дефибринированной крови барана. Посев культивируют в течение 24–48 часов при температуре 37°C в анаэробистате. При обнаружении колоний, характерных по форме, цвету, характеру поверхности для рода *Clostridium*, из них готовят мазки, которые окрашивают и микроскопируют общепринятыми методами.

При наличии в мазках характерных грамположительных клеток и спор, сходных по морфологии с *Clostridium spp.*, проводят отсев отдельных колоний на среду Китт–Тароцци, МППБ и кровяной агар и яично-желточный агар для получения чистой культуры и накопления. Параллельно культуры сеют в МПБ и на МПА для выявления аэробов и факультативных анаэробов. Для работы отбирают культуры, которые не дают роста в контрольных посевах.

При наличии чистой культуры, что подтверждается обнаружением в мазках однородных клеток и типичными колониями на агаре, проводят изучение его биохимических свойств для идентификации вида и типа возбудителя.

Культуры клостридий 24–48 ч. роста со среды Китта–Тароцци или суспензии клеток, смытых с агара, засевают в пробирки с желатином, мясо-пептонным бульоном, лакмусовым молоком, с набором полужидких питательных сред с добавлением углеводов или многоатомных спиртов и культивируют в анаэробистате. Результаты исследования оценивают ежедневно в течение 10 сут.

Определение ферментативных свойств клостридий является надежным методом идентификации их до вида, что отражено в различных определителях, наиболее актуальными из которых является определитель Берджи [36, 48].

Современные диагностические наборы (МикроЛаТест, RapID Ana II и др.) позволяют не использовать классические среды Гисса. Они представляют собой микротитровальные пластиковые стрипы, содержащие определенное количество лунок с субстратами. В каждой лунке содержится отдельный высушенный субстрат, активация которого происходит после добавления суспензии исследуемого микроорганизма. Субстрат при этом растворяется и вступает в реакцию с образуемыми микроорга-

низмом ферментами, что проявляется в виде окрашивания содержимого лунки. Биохимические реакции проявляются изменением цвета, что оценивается визуально. В отдельных случаях бывает необходимо добавление в часть лунок специальных реагентов, способствующих активации прохождения реакции и изменению окраски субстрата [6, 18, 27, 49, 52].

**Определение токсичности выделенных культур.** Окончательную идентификацию возбудителей подтверждают путем определения продукции экзотоксинов и их инактивации специфическими сыворотками. Поскольку все патогенные клоstrидии образуют в процессе роста видоспецифические токсины, их идентификация позволяет быстро и правильно поставить диагноз. Токсин в материале определяют по наличию летального эффекта после внутривенного введения белым мышам центрифугата или фильтрата суспензии патологического материала, а тип токсина — по нейтрализации летального эффекта в реакции со специфическими антитоксическими сыворотками на белых мышах [20].

Для идентификации токсина в реакции нейтрализации исследуемый материал (надсадок или фильтрат культуральной жидкости) делят на две пробирки. В первую пробирку вносят равное количество антитоксической видоспецифической сыворотки с активностью 5–10 АЕ, во вторую пробирку к материалу вместо сыворотки добавляют стерильный физиологический раствор [33].

Постановка реакции нейтрализации делается с диагностическими антитоксическими сыворотками *C. perfringens* типов А, С, Д, и Е [20, 48].

Для определения типа основных летальных токсинов *C. perfringens* в РН используют содержимое кишечника павших животных и/или фильтраты культур *C. perfringens* и стандартные антитокси-

ческие сыворотки к альфа-, бета-, эпсилон- и йота-токсинам *C. perfringens*.

РН ставят на белых мышах, реже морских свинках или кроликах. При постановке реакции на мышах результаты оцениваются по гибели или выживанию животных, обработанных смесью сывороток и токсина. При использовании морских свинок (кроликов) определяют наличие или отсутствие дерманекротического действия смесей сывороток и токсина на месте их внутрикожного введения. Для этого у животных удаляют шерсть на боку (ближе к сагиттальной линии) и на следующий день в это место вводят смеси сывороток и токсина.

Для определения типа основного токсина исследуемый материал разливают по 1,0 см<sup>3</sup> в пять пробирок и добавляют по 1,0 см<sup>3</sup> сыворотки каждого типа: в первую пробирку сыворотку типа А, во вторую — типа С, в третью — типа D, в четвертую — типа Е (активность сывороток каждого типа предварительно устанавливают 10 АЕ), в пятую добавляют 1,0 см<sup>3</sup> физиологического раствора (контроль). Смесь сывороток и исследуемого материала после выдерживания при 37–38°C в течение 30 мин. вводят по 0,5 см<sup>3</sup> внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам или внутрикожно по 0,2 см<sup>3</sup> морской свинке или кролику. Одновременно в тех же дозах вводят материал из контрольной пробирки. Для каждой смеси используют отдельный шприц. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч.

Результаты реакции нейтрализации учитывают при гибели контрольных белых мышей или образовании некроза в контроле у морской свинки (кролика).

Животные, получившие смесь токсина с гомологичной сывороткой, остаются живыми, а у морских свинок и кроликов некроз не развивается [20, 29, 44].

**Лечение** злокачественного отека должно быть начато как можно быстрее, пока

нет выраженного поражения тканей. При выборе схемы лечения необходимо учитывать биологические особенности анаэробов, патогенез и форму проявления болезни и максимально быстро создать неблагоприятные условия для роста и размножения возбудителей, чтобы предупредить гангренозные процессы в тканях.

Наиболее важными этапами являются антибиотикотерапия и хирургическая обработка пораженных тканей. После обезболивания проводят иссечение омертвевших тканей в пораженных участках, не допуская образования карманов. Ткани в зоне гангренозного поражения рассекают лампасными разрезами в пределах отека, до границы признаков кровоточивости. Раны длительно (до 20 мин.) промывают горячими (~40°C) гипертоническими растворами солей с перекисью водорода, перманганатом калия или хлорамином, после чего дренируют с применением дезинфицирующих бактерицидных средств либо обильно пропудривают антибиотиками. Для купирования причин заболевания и лечебных мероприятий целесообразно использовать комплексные антимикробные препараты в увеличенных дозах, при этом их вводят как для системного действия, так и обильно обкалывают ткани вокруг очага поражения.

Выраженным лечебным эффектом обладает оксигенотерапия, при которой в зону анаэробного очага и пограничные здоровые ткани через иглу нагнетают кислород из кислородной подушки.

Неспецифическое лечение заключается в использовании средств и методов, облегчающих течение болезни. Для обезболивания применяют новокаино-антибиотиковые блокады, интоксикацию снимают выведением различных растворов, например 40%-ного гексаметилентетрамина и кофеина, 10% раствора кальция хлорида с 20%-

ным раствором глюкозы, 10% реополиглюкина и др.

Все же лечение животных при злокачественном отеке стоит рассматривать с экономической точки зрения. Даже после выздоровления из-за обширных поражений тканей и последующей потери животным продуктивности лечение часто нецелесообразно.

**Специфическая профилактика клещидиозов.** В связи с острым или сверхострым течением болезни и тяжестью поражения тканей организма лечение животных почти в 100% случаев неэффективно. Основным способом предотвращения злокачественного отека является специфическая профилактика.

Эффективность вакцин зависит от многих факторов, в том числе количества и качества антигена, консервантов, адьюванта, иммуностимуляторов, технологии изготовления препарата, схемы его применения. Важную роль играет и иммунный статус организма животного.

При создании средств специфической профилактики исследователи должны стремиться к разработке идеальной вакцины, которая при однократном введении обеспечивала бы пожизненный иммунитет к большинству инфекционных болезней и обладала при этом абсолютной безопасностью для организма. К сожалению, в настоящее время таких вакцин не существует, но при разработке новых иммунобиологических препаратов следует к этому стремиться. Одним из способов достижения этой цели является разработка ассоциированных вакцин, которые позволяют оптимизировать схему вакцинаций, снизить количество стрессов у животных и трудозатраты. Теоретически число компонентов в вакцинах может быть неограниченным, однако следует учитывать, что взаимодействие антигенов в препарате часто снижает его эффективность. Связано это со значительной антигенной

нагрузкой из-за большого количества вводимых чужеродных веществ, высокой концентрацией белковых соединений и т.д. и проявляется возникновением нежелательных системных (аллергии, анафилаксия, abortionы и т.д.) и/или местных реакций (отеки, абсцессы, уплотнения). Нежелательных эффектов можно избежать путем правильного подбора антигенов и их концентраций в комплексных вакцинах. Есть достаточно много примеров, когда специфическая профилактика осуществляется с помощью ассоциированных вакцин, при этом обеспечивается высокий уровень иммуногенности. Также следует учитывать преобладание ожидаемой пользы применения вакцины над риском возникновения нежелательных последствий.

Клостридии больше других возбудителей инфекционных болезней животных подходят для создания ассоциированных препаратов, так как сходны в антигенном плане. Несмотря на значительное разнообразие клинических форм болезней, они имеют одинаковый патогенез, при котором болезнь возникает за счет высокоактивных токсинов, образующихся при попадании бактерий в ткани организма.

Поскольку анаэробные инфекции часто вызываются ассоциацией возбудителей, для профилактики также целесообразно использовать ассоциированные вакцины, включающие широкий спектр клинически значимых возбудителей таких болезней, как злокачественный отек, анаэробная энтеротоксемия, некротический гепатит, брадзот, столбняк и др. [6, 16, 19].

В настоящее время в РФ зарегистрированы две отечественных («Клостбовак-8» и «Антоткс-9») и несколько импортных вакцин против злокачественного отека. Все имеющиеся вакцины ассоциированные и включают в себя очищенные концентрированные ана-

токсины *C. perfringens* типов A, C, D, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. tetani* и культуру *C. Chauvoei*. Некоторые имеют более широкий антигенный состав.

Схема профилактической иммунизации животных имеет определенные сходства. Иммунизацию начинают со стельных животных, что позволяет индуцировать не только иммунитет у матерей, но и колостральный иммунитет у новорожденных телят. Двукратная иммунизация обеспечивает невосприимчивость животных к таким болезням, как злокачественный отек, столбняк, эмфизематозный карбункул, анаэробная энтеротоксемия, брадзотоподобные заболевания, некротический гепатит, некротический энтерит и других болезней, ассоциируемых с анаэробами.

## Литература

- Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам. Сибирский вестник с.-х. науки. 2017; 47(1): 90–96.
- ГОСТ 26503-85. Методы лабораторной диагностики клостридиозов. М., 1985; 16.
- Каган Ф.И., Кириллов Л.В. Специфическая профилактика клостридиозов животных. М., 1976; 152.
- Капустин А.В., Алипер Т.И. Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота. Материалы VII межд. ветеринарного конгресса. 2017; 106–108.
- Капустин А.В., Моторыгин А.В., Букова Н.К. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота. Вестник ветеринарии. 2013; 1(64): 71–73.
- Коваленко Я.Р. Анаэробные инфекции сельскохозяйственных животных. М., 1954; 338.

7. Панин А.Н., Татаринцев Н.Т. Основные требования к производственным и контрольным штаммам микроорганизмов. Ветеринария. 1993; 4: 28–29.
8. Редкозубова Л.И. Контроль клостридий — систематическая вакцинация. Ветеринария. 2016; 1: 9–12.
9. Самуиленко А.Я., Мельник Н.В., Денисов А.А., Тарасова И.И., Джавадов Э.Д., Попов Н.И., Гулюкин А.М., Барсуков Ю.И. и др. Рекомендации по проведению ветеринарной дезинфекции на животноводческих комплексах и биопредприятиях. М., 2014.
10. Семенова В.Д. Применение полых волокон для концентрации токсина перфирингенса. Тез. докладов итоговой научн. конф. Пермь. 1984; 11–12.
11. Скляров О.Д. Капустин А.В., Лайшевцев А.И. Изучение безопасности применения ассоциированной вакцины против клостридиозов КРС для животных различных возрастных и физиологических групп. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2017; 65: 124–130.
12. Скляров О.Д., Шемельков Е.В., Лайшевцев А.И., Гулюкин А.М., Капустин А.В. Эпизоотологический надзор и мониторинг в условиях мегаполиса // Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск.: АНС «СибАК», 2019; 167–184. DOI 10.31016/RG.2.2.22203.77607-01.
13. Терентьева Т.Е., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах. Российский вет. журнал. 2016; 1: 5–9.
14. Ургуев К.Р. Клостридиозы животных. Россельхозиздат. М., 1987; 183.
15. Хангажинов А.А. Распространение патогенных анаэробов в различных типах почв Республики Бурятия и эпизоотологический мониторинг вызываемых ими клостридиозов. Дис. ... канд. вет. наук. Улан-Удэ, 2012; 148.
16. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Белименко В.В. Эпизоотологический надзор и мониторинг в условиях мегаполиса // Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск: АНС «СибАК», 2019; 167–184.
17. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Д.Ж., Уильямс С. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997; 1: 432.
18. Braham Robert B., Kahler Ralph C. *Clostridium septicum* as a cause of pericarditis and mycotic aneurysm. Clin. Microbiol. 1990; 28(10): 2377–2378.
19. Bueschel D., Walker R., Woods L. Enterotoxigenic *C. perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998; 213: 1305–1307.
20. Ceci L., Paradies P., Sasanelli M. et al. Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* type A in the disease complex. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 2006; 53: 518–523.
21. Chakravorty A. The pore-forming alpha-toxin from *Clostridium septicum* activates the MAPK pathway in a Ras-c-Raf-dependent and independent manner. Toxins (Basel). 2015; 7: 516–534.
22. Dennison A.C., Van Metre D.C., Morley P.S. et al. Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2005; 227(1): 132–138.

23. Eustis S.L., Bergeland M.E. Suppurative abomasitis associated with *C. septicum* infection. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1981; 178: 732–734.
24. Ferrarezi M.C., Cardoso T. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. Anaerobe. 2008; 4: 328–331.
25. Finnie JW. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. J. Comp. Pathol. 1984a; 94: 363–370.
26. Flores-Diaz M., Alape-Giron A. Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. Toxicon. 2003; 42: 979–986.
27. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene. 1997; 203: 65–73.
28. Griner L.A., Aichelman W.W., Brown G.D. *Clostridium perfringens* type D (ETX) enterotoxemia in brown swiss dairy calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1956; 129: 375–376.
29. Hickey M.J., Kwan R.Y., Awad M.M. et al. Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. Pathog. 2008; 4.
30. Kennedy C.L. Pore-forming activity of alpha-toxin is essential for *Clostridium septicum*-mediated myonecrosis. Infect. Immun. 2009; 77: 943–951.
31. Manteca C., Daube G., Jauniaux T. Role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia. Vet. Microbiol. 2002; 86: 191–202.
32. Mukamoto M. Analysis of tryptophan-rich region in *Clostridium septicum* alpha-toxin involved with binding to glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. Microbiol. Immunol. 2013; 57: 163–169.
33. Multer T., Morgan M.M., Fabry G. *Clostridium septicum* gangrene complicating a closed femoral fracture. Acta orthopacol. belg. 1993; 59(4): 416–419.
34. Nakano P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. Histochem. Cytochem. 1974; 22(12): 1084–1091.
35. Niilo L., Moffatt R.E., Avery R.J. Bovine enterotoxemia. II. Experimental reproduction of the disease. Can. Vet. J. 1963; 4: 288–297.
36. Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. Can. Vet. J. 1980; 21: 141–148.
37. Niilo L. Experimental production of hemorrhagic enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type C in maturing lambs. Can. J. Vet. Res. 1986; 50: 32–35.
38. Oda M., Matsuno T., Shiihara R. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. J. Lipid. Res. 2008; 49: 1039–1047.
39. Popoff M., Duchesnes C., Mainil J., Pelkonen S., Menozzi M.G. Overview of *Clostridium* identification. In: Diagnosis, epidemiology and antibiotic resistance of the genus *Clostridium*. Presses Fac. Méd. Vét. ULg. Liège. Belgium. 15–21.
40. Popoff M.R. Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. Anaerobe. 2014; 30: 220–238.
41. QaDan M. pH-enhanced cytopathic effects of *Clostridium sordellii* lethal toxin. Infect. Immun. 2001; 69: 5487–5493.
42. Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. Enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* types B, C and E. In: Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9<sup>th</sup> ed. 2000; 770.
43. Riccio J.A., Oberkircher O.R. *Clostridium septicum* sepsis and celebritis: A rare complication of the hemolytic-uremic syndrome. Pediat. Infec. Disease J. 1988; 342–345.
44. Roeder B.L., Chengappa M.M., Nagataja T.G., Avery T.B., Kennedy G.A. Ex-

- perimental induction of abdominal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration by intraruminal inoculation of *Clostridium perfringens* type A in neonatal calves. Am. J. Vet. Res. 1988b; 49: 201–207.
45. Sakurai J., Nagahama M., Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. J. Biochem. 2004; 136: 569–574.
  46. Sakurai J., Duncan C. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. Infect. Immun. 1977; 18: 741–745.
  47. Sayeed S., Uzal F.A., Fisher D.J. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. Mol. Microbiol. 2008; 67: 15–30.
  48. Sayeed S., Robertson S.L., Caserta J.A., McClane B.A., Bruggemann H., Gottschalk G. Improved understanding of the action and genetics of *Clostridium perfringens* enterotoxin suggests potential application for cancer therapy and drug delivery. Clostridia: Molecular Biology in the post-genomic era. G, Eds. Norfolk: Caister academic press. 2009; 29–46.
  49. Schotte U., Tryuen U., Neubauer H. Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors a review. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health. 2004; 51: 423–426.
  50. Smedley J.G., Fisher D.J., Sayeed S., Chakrabarti G., McClane B.A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2004; 152: 183–204.
  51. Soler-Jover A., Dorca J., Popoff M.R. Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells. Toxicon. 2007; 50: 530–540.
  52. Songer J.G., Rood J.L., McClane B.A., Titball R.W. Molecular and immunological methods for the diagnosis of clostridial diseases. In: The clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press. 1997; 491–503.
  53. Songer J.G., Miskimins D.W. *Clostridial abomasitis* in calves: case report and review of the literature. Anaerobe. 2005; 11: 290–294.
  54. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. 1996; 9: 216–234.
  55. Stiles B., Hale M.L., Marvaud J.C., Popoff M.R. *Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry. Infect. Immune. 2000; 68: 3475–3484.
  56. Tamai E., Ishida T., Miyata S. et al. Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. Infect. Immun. 2003; 71: 5371–5375.
  57. Titball R.W., Naylor C.E., Basak A.E. The *Clostridium perfringens* — toxin. Anaerobe. 1999; 5: 51–64.
  58. Uzal F.A., Saputo J., Sayeed S. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemias. Infect. Immun. 2009; 77(12): 5291–5299.

# АНАЭРОБНАЯ ЭНТЕРОТОКСЕМИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Капустин А.В.

Анаэробная энтеротоксемия (*Enterotoxæmia bovum*) — острая инфекционная болезнь новорожденных телят, возникающая в результате интенсивного размножения в кишечнике клостридий. Культуры *Cl. perfringens* различных типов при росте образуют высокоактивные токсины, обладающие некротической, гемолитической и летальной активностью, которые после всасывания в кровь приводят к общей интоксикации с признаками поражения нервной системы, почек и желудочно-кишечного тракта. Заболевание широко распространено, поскольку *Cl. perfringens* являются постоянными обитателями кишечника, а также обнаруживаются в почве, воде, навозе, коржах [6].

**Этиология.** Анаэробная энтеротоксемия, вызванная *Clostridium perfringens*, актуальна для животноводства во всем мире, в том числе в РФ. Основной возбудитель болезни — *Cl. perfringens* тип С — короткая, толстая, неподвижная спорообразующая палочка ( $4-8 \times 1-1,5$  мкм), окрашивающаяся грамположительно в молодых и грамотрицательно — в старых культурах. В большинстве случаев энтеротоксемия, вызванная *Cl. perfringens* тип

С, является самостоятельным заболеванием, но также часто протекает на фоне различных вирусных инфекций и в ассоциации с эшерихиозом. В организме животного, а также при культивировании на питательных средах с сывороткой и кровью культуры *Cl. perfringens* образуют капсулу, а во внешней среде — споры [1].

При росте на среде Китта—Тароцци *Cl. perfringens* вызывает помутнение с обильным газообразованием уже через 3–4 часа, через 24–48 часов бактерии выпадают в осадок и среда просветляется. На агаризованных средах с добавлением крови и глюкозы *Cl. perfringens* образует круглые выпуклые колонии, окруженные одной или двумя зонами гемолиза. Желатин разжижает, молоко свертывает с образованием сгустка, индол не образует, ферментирует глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, лактозу, крахмал, гликон с образованием кислоты и газа, не ферментирует маннит.

Тип возбудителя определяют в реакции нейтрализации токсинов с типовыми антитоксическими сыворотками. Наиболее значимыми токсинами являются альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ), и йота ( $\zeta$ ) [2, 7, 27].

Таблица 1. Токсины и ферменты основных типов *C. perfringens*

Наименование возбудителя	Наименование токсинов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\eta$	$\theta$	$\zeta$	$\chi$	$\lambda$	$\mu$	$\nu$
	альфа	бета	гамма	дельта	эпсилон	эта	тета	йота	каппа	ламбда	мю	ню
<i>C. perfringens</i> т. А	+++	—	—	—	—	±	±	—	++	—	+	+
<i>C. perfringens</i> т. С	±	+++	±	±	—	—	±	—	++	—	—	+
<i>C. perfringens</i> т. Д	±	—	—	—	+++	—	±	—	±	±	±	+

+++ — основной летальный и некротический токсин, образуемый всеми штаммами указанного типа;

++ — токсин, образуемый многими штаммами;

+ — токсин или фермент, образуемый всеми штаммами вида в небольшом количестве;

± — токсин или фермент, образуемый некоторыми количествами штаммов.

Споровая форма возбудителя обладает высокой устойчивостью к внешним факторам и длительно сохраняется в почве, навозе, воде, на поверхности кожи и шерсти, выдерживает кипячение в течение нескольких минут. Вегетативная форма возбудителя, а также токсины менее устойчивы и быстро инактивируются кислородом, солнечным светом, высокой температурой, различными дезинфициантами.

**Эпизоотологические данные.** Источником возбудителя являются взрослые животные-бактерионосители, которые контактируют фекалиями почву, подстилку, предметы ухода, что обуславливает стационарность заболевания.

Заражение происходит алиментарным путем, в основном от матерей при сосании грязных сосков вымени или через предметы ухода. Реже возможно заражение телят между собой. Болезнь протекает спорадически, вначале возникают единичные случаи болезни, затем количество больных нарастает. Заболеваемость животных в отдельных группах может достигать 100%, а смертность — 60–80%, особенно при возникновении вспышки на невакцинированном поголовье.

Энтеротоксемия у телят, обусловленная типом А, может возникать без заноса извне. Типы С и D являются причиной болезни у животных более старшего возраста, находящихся на пастбищном содержании, на откорме с высоким соотношением концентратов в рационе. Возникновению болезни способствуют нарушения зоогигиенических и ветеринарно-санитарных правил и холодное время года [3, 6, 14, 26, 28].

**Патогенез.** Болезнь протекает в виде токсикоинфекции. Попадая в организм, *Cl. perfringens* быстро размножается, достигая концентрации ~10<sup>9</sup> и выше в 1 г содержимого кишечника буквально за 3–6 часов, и продуцирует высокоактив-

ные токсины. Прикрепляясь к энтероцитам, клетки *Cl. perfringens* приводят к их десквамации и проникают в кровяное русло организма животного. Некрозы слизистой, как правило, очень обширны и сопровождаются массовой кровопотерей через поврежденные сосуды. В последующем некрозы распространяются на все слои кишечной стенки, что приводит к перитониту. Может наблюдаться эмфизема пораженных участков кишечника.

Однако ключевым фактором патогенеза является бета-токсин *Cl. perfringens*, который, накапливаясь в кишечнике, способствует нарушению моторной и секреторной деятельности. Стоит отметить, что при экспериментальном введении чистого бета-токсина без живых клеток *Cl. perfringens* удавалось воспроизвести картину анаэробной энтеротоксемии с признаками токсического поражения головного мозга, нефрозами, отеком легких, при этом поражения слизистой оболочки кишечника не наблюдалось. Заражение животных бактериальными культурами позволяет получить классическую форму анаэробной энтеротоксемии [4, 5].

Появление болезни у новорожденных телят связано с присутствием в молозиве ингибиторов трипсина, который у более взрослых животных способствует инактивации токсинов. После снижения в молозиве и молоке уровня ингибиторов активность трипсина возрастает, что предупреждает развитие болезни [8].

Кроме того, клоstrидиоз может протекать в ассоциированном виде, например с пастереллезом, сальмонеллезом, эшерихиозом и т.д., что необходимо учитывать при диагностических исследованиях [2].

**Клинические признаки.** Симптомы энтеротоксемии, несмотря на различные типы, достаточно похожи и характеризуются нарушением функции пищеварительной системы и нервыми про-

явлениями. Болезнь протекает остро, иногда молниеносно, телята гибнут до проявления клинических признаков, от сильнейшей интоксикации. Инкубационный период длится от нескольких часов до 2–3 суток. При более длительном течении болезни у телят отмечаются отсутствие аппетита, отказ от приема воды, угнетение, плавательные движения, приступы судорог, живот болезненный, диарея, тяжелое дыхание, кожное дыхание поверхностное, видимые слизистые оболочки синюшные. В ходе выработки токсина блокируется работа иммунной системы, что делает ее уязвимой к вторичным заболеваниям.

При подострой и хронической форме болезнь может длиться до 5–7 дней. Падеж телят происходит от прогрессирующей диареи, обезвоживания и истощения.

Патологоанатомические изменения. Погибшие от сверхострой формы болезни животные, как правило, не имеют каких-либо характерных внешних патологических признаков, наблюдается лишь загрязнение фекалиями перианальной области, бедер и брюшной стенки. При

острой форме отмечают вздутие трупа, кровянистые пенистые выделения из носовой полости, анемичность видимых слизистых оболочек. На эндокарде, эпикарде и тимусе — множественные точечные и пятнистые кровоизлияния.

Наиболее характерным и ярким признаком при вскрытии является геморрагический энтерит с поражением тощей и подвздошной кишок, иногда с захватом проксимальной части толстого кишечника. Содержимое кишечника жидкое, кровянистое, наполнено большим количеством пузырьков газа, которые могут быть и в стенке пораженных участков.

При хронической форме — некрозы кишечника, которые обнаруживаются в основном в тощей кишке. При длительном течении болезни наблюдается фрагментарное утолщение кишечника, слизистая оболочка сморщенная, с попутно выступающими продольными бороздками серо-желтого цвета и многочисленными изъязвлениями. В брюшной полости — признаки серозно-фибринозного перитонита, спайки петель кишечника, печень глинистого цвета, дряблая. В почках и на эпикарде — точечные кро-



Рис. 1. Поражение тонкого отдела кишечника при энаэробной энтеротоксемии

воизлияния, в редких случаях отмечается размягчение паренхимы почек. Селезенка без изменений или слегка увеличена. Как правило, наблюдается отек легких.

Для энтеротоксемии, обусловленной *C. perfringens* типа А, характерна анемичность подкожной клетчатки. Скопление в брюшной полости кровянистой жидкости. Расширение сицуга, обширные некрозы слизистой оболочки с изъязвлениями. Катаральное воспаление слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, местами кровоизлияния. Мезентериальные лимфатические узлы увеличены и отечны. Печень кровенаполнена, увеличена в объеме, дряблой консистенции. На эпикарде точечные кровоизлияния, легкие отечные. В грудной полости жидкость красноватого цвета. Поражения могут быть диффузными или очаговыми. Содержимое сицуга красно-коричневого цвета, густой консистенции с пузырьками газа.

**Диагностика.** Диагноз на анаэробную энтеротоксемию ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений. Для подтверждения диагноза обязательным являются лабораторные исследования с выделением чистой культуры возбудителя с идентификацией его до вида и/или определение типа производимых токсинов.

При подозрении на анаэробную энтеротоксемию в лабораторию направляют свежие трупы целиком или кусочки паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка), сердце с перевязанными сосудами, трубчатую кость, отрезок тонкого кишечника с содержимым, концы которого перевязывают шпагатом.

Отбор проб материала необходимо проводить до применения антибактериальных препаратов, при отсутствии такой возможности — непосредственно перед повторным введением.

Учитывая чувствительность клостридий к кислороду, материал отправляют в лабораторию немедленно после взятия с целью сохранения жизнеспособности возбудителя и предотвращения избыточного роста сопутствующей микрофлоры. Жидкий материал целесообразно пересыпать в шприцах, полностью удалив из них пузырьки воздуха, а кусочки тканей должны быть достаточно крупными (100–200 г), чтобы в толще материала обеспечивалась выживаемость клостридий.

Пробы транспортируют и хранят до начала исследования в холодильнике при температуре 2–8°C. В случае использования для отбора и транспортирования в лабораторию проб материала специальных пробирок с транспортировочной средой допускается хранение при комнатной температуре (18–20°C). Специальные транспортировочные среды для анаэробов позволяют обеспечить жизнеспособность бактерий в течение 48–72 ч. При отправке на исследование кишечно-го содержимого его консервируют путем добавления 2–3 капель хлороформа на 10 мл содержимого.

Отобранные пробы должны быть доставлены в лабораторию не позднее 4 ч. с момента гибели животного, а консервированные — в течение 2 суток.

В случае невозможности отправки материала в лабораторию сразу после взятия допускается его однократное замораживание, транспортирование и хранение при температуре минус 18°C и ниже.

Для установления источника заражения возможно направление на исследование объектов окружающей среды (почва, трава, фураж, подстилка, вода, смывы и т.д.).

Исследование на клострдиоз реализуют согласно ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клострдиозов».

Необходимо дифференцировать анаэробную энтеротоксемию от эшерихиоза, сальмонеллеза, диплококковой инфекции, диспепсии, сибирской язвы, эмфизематозного карбункула, пастереллеза, отравлений.

**Биологический метод диагностики.** Одновременно с посевом часть приготовленной суспензии патологического материала используют для заражения двух морских свинок, которым материал вводят внутримышечно в объеме 0,5–1,0 см<sup>3</sup>. Наблюдение за животными продолжается в течение 24–72 часов. Клинический осмотр зараженных животных проводят ежедневно, обращая внимание на общее состояние, угнетенность, повышение температуры, наличие воспаления на месте инъекции. При гибели животных с вышеперечисленными признаками проводят вскрытие трупа с отбором материала для бактериологического исследования. Для посевов с целью выделения чистой культуры возбудителя используют кровь из сердца, печень, экссудат с места инъекции.

**Определение токсичности выделенных культур.** *Cl. perfringens* образуют в процессе роста видоспецифические токсины, которые могут быть идентифицированы в ходе исследования. Токсин в материале определяют по наличию летального эффекта после внутривенного введения белым мышам центрифугата или фильтрата суспензии патологического материала, а тип токсина — по нейтрализации летального эффекта в реакции со специфическими антитоксическими сыворотками на белых мышах.

Для идентификации токсина в реакции нейтрализации (РН) исследуемый материал (надосадок или фильтрат культуральной жидкости) делят на две пробирки, в первую пробирку вносят равное количество антитоксической видоспецифической сыворотки с активностью 5–10 АЕ, во вторую пробир-

ку к материалу вместо сыворотки добавляют стерильный физиологический раствор. Смеси тщательно перемешивают, выдерживают в термостате при 37°C в течение 45 минут для нейтрализации. Затем каждую смесь вводят внутривенно двум белым мышам в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Тип токсина, а соответственно, и вид возбудителя считается установленным, если в течение 24 часов произойдет гибель контрольных животных, которым вводили смесь материала с физиологическим раствором, при этом подопытные мыши останутся живы.

Постановку РН можно отнести к экспресс-методам лабораторной диагностики клостридиозов, так как видоспецифический токсин можно обнаружить и без проведения бактериологического исследования. Данный метод применим ко всем видам клостридий при наличии в лаборатории стандартных антитоксических сывороток к различным токсинам. По такой же схеме проводят определение типа летальных токсинов *Cl. perfringens*, для чего используют диагностические антитоксические сыворотки *Cl. perfringens* типов А, С, D и Е. Для определения типа токсинов *Cl. perfringens* в РН используют содержимое кишечника павших животных и/или фильтраты культур и стандартные антитоксические сыворотки к альфа, бета, эпсилон и йота токсинам *Cl. perfringens*, что позволяет идентифицировать основные типы возбудителя. Исследуемый материал разливают по 1,0 см<sup>3</sup> в пять пробирок и добавляют по 1,0 см<sup>3</sup> сыворотки каждого типа: в первую пробирку — сыворотку типа А, во вторую — типа С, в третью — типа D, в четвертую — типа Е (активность сывороток каждого типа предварительно доводят стерильным физиологическим раствором до 10 АЕ), в пятую добавляют 1 см<sup>3</sup> физиологического раствора (контроль). Смесь сывороток и исследуемого материала после выдерживания

при 37–38°C в течение 30 мин. вводят по 0,5 см<sup>3</sup> внутривенно или внутрибрюшно двум белым мышам. Одновременно в тех же дозах вводят испытуемую культуру без сыворотки (контроль). Для каждой смеси используют отдельный шприц. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч. Результаты реакции нейтрализации учитывают при гибели контрольных белых мышей. Оценку результатов проводят в соответствии с табл. 1 [10].

**Альтернативные методы диагностики.** Стоит отметить, что в мире в настоящее время происходит постепенная замена стандартных тестов выявления токсинов клоstrидий в реакции нейтрализации на мышах в связи с их трудоемкостью, высокой стоимостью и негуманностью из-за большого количества используемых мышей на иммуноферментные методы выявления. Также разработана ПЦР-тест-система для выявления генов *Clostridium perfringens*, ответственных за токсикообразование, что может быть очень информативным вспомогательным методом диагностики [9].

**Лечение.** Лечение телят после появления клинических признаков анаэробной энтеротоксемии является, как правило, бесполезным или малоэффективным в связи с наступлением необратимых поражений органов и тканей. С целью недопущения заболевания новых животных в момент развития энзоотии применяют различные antimикробные препараты или их комбинации. Использование антибиотиков при своевременно начатом лечении позволяет достичь хорошего терапевтического эффекта.

Эффективно также использование специфической антитоксической сыворотки, введение которой нейтрализует действие поступивших в кровь токсинов и блокирует развитие болезни.

Профилактика анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота основывается на проведении комплекса

организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и специфических мероприятий, направленных на предотвращение заражения животных, особенно молодняка. В каждом животноводческом предприятии должен проводиться мониторинг клоstrидиозов. Регулярная дезинфекция, механическая очистка помещений должны сопровождать все технологические процессы выращивания скота. За больными животными назначается отдельный персонал.

**Специфическая профилактика** является наиболее надежным способом борьбы с анаэробной энтеротоксемией. В РФ зарегистрированы две отечественные вакцины (Клоствак-8 и Антокс-9) и ряд импортных иммунобиологических препаратов для предотвращения этого заболевания. Механизм действия указанных препаратов идентичный: двукратная иммунизация стельных коров и нетелей обеспечивает образование высокого титра специфических антитоксических антител (не менее 10 МЕ), что позволяет после выпойки молозива создать у новорожденных телят колостральный иммунитет высокой степени напряженности и предотвратить развитие болезни. В последующем коров вакцинируют за 3–4 недели перед каждым следующим отелом однократно. Учитывая, что полной санации животных от возбудителя добиться невозможно в связи с его убiquитарностью, хорошим эффектом вакцинации можно считать десятикратное уменьшение смертности телят, полученных от вакцинированных коров, в сравнении с предшествующим периодом.

Для оздоровления хозяйства от анаэробной энтеротоксемии проводят комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий, которые складываются из тщательного соблюдения зоогигиенических и ветеринарных правил содержания и кормления животных. Тщательная уборка и периодические дезинфекции

снижают риск заболевания анаэробной энтеротоксемией.

Проводят дезинфекцию помещений, используя формальдегид, хлорную известь, едкий натрий, которые инактивируют возбудителя за 15–20 минут.

## Литература

1. Капустин А.В., Алипер Т.И. Эпизоотология и профилактика клоstrидиозов крупного рогатого скота. Материалы VII Международного ветеринарного конгресса. Уфа. 2017; 106–108.
2. Капустин А.В. Этиологическая структура и специфическая профилактика клоstrидиозов крупного рогатого скота и овец. Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2019; 288.
3. Кисленко В.Н., Колычев Н.М., Суворина О.С. Возбудители инфекционной анаэробной энтеротоксемии. Ветеринарная микробиология и иммунология. М.: КолосС, 2007; 64–67.
4. Куриленко А.Н., Крупальник В.Л., Пименов Н.В. Бактериальные и вирусные болезни молодняка с.-х. животных. М.: КолосС, 2006; 296.
5. Насертдинов Д.Д. Разработка и оценка эффективности полиспецифической гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Дис. ... канд. вет. наук. Казань, 2018; 142.
6. Радионова К.П., Карабанова О.В. Клоstrидиозы сельскохозяйственных животных. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2010; (9): 12–14.
7. Спиридонов А.Г. Разработка эффективности вакцины ассоцииированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2013; 18.
8. Спиридонов А.Г., Макаев Х.Н., Спиридонов Г.Н. Комбинированный метод лечения и профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена Знак Почета государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. Витебск. 2018; 54(4): 129–133.
9. Wilson A.J. Observations on the classification of *Bacillus welchii*. Univ. Cambridge. inst Ann. Path. 2<sup>nd</sup> report. 1931; 53(37): 211–230.
10. Slavic D., Boerlin P., Fabri M., Klotins K.C., Zoethout J.K., Weir P.E., Bateman D. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. Can. Jour. Vet. Res. 2011; 75: 89–97.
11. Carter G.P., Cheung J.K., Larcombe S., Lyras D. Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia. Mol. Microbiol. 2014; 91: 221–231.
12. Sengupta N., Alam S.I., Kumar B., Kumar R.B., Gautam V., Kumar S., Singh L. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of *Clostridium perfringens* type A and type C strains. Infection and Immunity. 2010; 78(9): 3957–3968.
13. Cook T.M., Protheroe R.T., Handel J.M. Tetanus: A review of the literature. Br. J. Anaesth. 2001; 87: 477–487.
14. Songer J.G., Gyles C.L., Prescott J.F., Thoen C.O. Enteric Clostridia. Pathogenesis of bacterial infection in animals. 2010; 4: 211–218.
15. Kiu R., Hall L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerg. Microbes Infect. 2018; 7: 1–15.
16. Lotfollahzadeh S., Heydari M., Mohebbi M.R., Hashemian M. Tetanus outbreak in a sheep flock due to ear tagging. Vet. Med. Sci. 2019; 5: 146–150.
17. Lund B.M. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. Lancet. 1990; 336: 982–986.

18. Gohari M., Kropinski A.M., Weese S.J., Whitehead A.E., Parreira V.R., Boerlin P., Prescott J.F. NetF-producing *Clostridium perfringens*: Clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. *Infect. Genet. Evol.*, 2017; 49: 32–38.
19. Lindstrom M., Heikinheimo A., Lahti P., Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol.* 2011; 28: 192–198.
20. Johnson S. Antibody responses to clostridial infection in humans. *Clin. Infect. Dis.*, 1997; 25: S173-S177.
21. Savic B., Prodanovic R., Ivetic V., Radanovic O., Bojkovski J. Enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in 9-month-old calves. *Can. Vet. J.* 2012; 53: 174–176.
22. Sengupta, Alam S.I., Kumar B., Kumar R.B., Gautam V., Kumar S., Singh L. Infection and Immunity. 2010; 78(9): 3957–3968.
23. Singh B.R., Li B., Read D. Botulinum versus tetanus neurotoxins: Why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? *Toxicon*. 1995; 33: 1541–1547.
24. Spiridonov G.N. et al. The development of preparations for specific prevention and treatment of anaerobic enterotoxemia and escherichiosis in calves. *BALI MEDICAL JOURNAL*. 2017; 6(2): 367–371.
25. Stevens D.L., Aldape M.J., Bryant A.E. Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe*. 2012; 18: 254–259.
26. Smedly J.G., Fisher D.J., Sayeed S., Chakrabarti G., McClane B.A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004; 152: 183–204.
27. Uzal F.A. et al. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. *Anaerobe*. 2018; 53: 11–20.
28. Uzal F.A., McClane B.A. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet. Microbiol.* 2011; 153: 37–43.
29. Uzal F.A., Songer J.G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2008; 20: 253–265.
30. Vieco-Saiz N. et al. Antibiotic resistance, genome analysis and further safe traits of *Clostridium perfringens* ICVB082; a strain capable of producing an inhibitory compound directed only against a closely related pathogenic strain. *Anaerobe*. 2020; 62: 102177.
31. Wang Y. Bioinformatics analysis of NetF proteins for designing a multi-epitope vaccine against *Clostridium perfringens* infection. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020; 85: 104461.
32. Wang Y. Sialidases from *Clostridium perfringens* and their inhibitors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020; 9: 462.
33. Wells C.L., Balish E. *Clostridium tetani* growth and toxin production in the intestines of germfree rats. *Infect. Immun.* 1983; 41: 826–828.
34. Zaragoza N.E. et al. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. *Toxins*. 2019; 11(9): 525.

# НЕКРОБАКТЕРИОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Капустин А.В., Иванов Е.В.

**Некробактериоз** — инфекционная болезнь многих видов животных, характеризующаяся гнойно-некротическим поражением внутренних органов, слизистых оболочек и кожи, особенно в области конечностей.

Болезнь под различными названиями (некробактериоз, некробациллез, копытка, дифтерия телят, foot-abscess, foot-rot, infectious pododermatitis, foul-claw, hepatic necrobacillosis, toul-in-the-foot, necrotic laryngitis, ruminitis-liver abscess) известна с середины XIX века. Вначале заболевание было описано у овец, а затем и у других видов животных. Возбудитель впервые выделил Р. Кох в 1881 году и подробно описал Ф. Леффлер в 1882 году. В России некробактериоз изучали Н. Павловский (1909), Ф. Каган (1934), Я. Коваленко (1945).

Болезнь распространена во всех странах, имеющих развитое животноводство, и является серьезной проблемой заводчиков крупного рогатого скота, овец, северных оленей и некоторых других животных. В СССР у крупного рогатого скота болезнь получила широкое распространение с 1970-х годов, во время проведения повсеместной голштинизации и закупки за границей племенного скота. С начала 1990-х количество выявляемых случаев неблагополучия по некробактериозу пошло на спад в связи с резким сокращением поголовья и разукрупнением хозяйств.

Экономический ущерб от некробактериоза особенно велик в молочном и мясном скотоводстве (где поражаются конечности) и северном оленеводстве (где может погибать до 80% молодняка и до 30% взрослых оленей).

**Этиология.** Возбудитель болезни бактерия *Fusobacterium necrophorum* представляет собой грамотрицательные полиморфные палочки размером от 0,7–1,0 до 100–300 мкм. При окраске мазков из патологического материала и/или свежих культур *F. necrophorum* имеет форму длинных переплетающихся нитей с зернистой окраской и шаровидными утолщениями, которые прокрашиваются сильнее остальной клетки, спор и капсул не образуют, не-подвижные.



Рис. 1. Выраженная полиморфность клеток *Fusobacterium necrophorum*



Рис. 2. Колонии *Fusobacterium necrophorum* на кровяном агаре

*Fusobacterum necrophorum* является строгим анаэробом. Выделение чистой культуры возбудителя затруднено, поскольку образцы материала, как правило, сильно контаминированы сопутствующей быстрорастущей микрофлорой. Значительно облегчает получение чистой культуры постановка биопробы на лабораторных животных, белых мышах и кроликах, после заболевания и/или гибели которых культуру выделяют из печени, селезенки, сердца или материала с места инъекции. Для прижизненной диагностики используют кровь, пробы некротизированных тканей из очага инфекции и содержимое абсцессов.

Для выявления *F. necrophorum* используют среду Китта–Тароцци, мясо-пептонный печеночный бульон, сывороточный и глюкозно-кровяной агары, тиогликолевую и мозговую среды. При культивировании посевов в анаэробных условиях через 24–48 часов рост микрорганизма проявляется помутнением и слабым газообразованием, а на дне пробирки появляется осадок. В случае роста чистой культуры через 3–6 дней наступает просветление среды, бактериальные клетки выпадают в виде обильного осадка, разбивающегося при встряхивании в равномерную муть. При культивировании на глюкозо-кровянном агаре рост культур *Fusobacterum necrophorum* продолжается 2–3 дня, при этом образуются мелкие круглые матовые колонии светло-серого цвета. Достаточно часто встречаются гемолитичные штаммы, колонии которых окружены тонкой зоной гемолиза. В аэробных условиях культура продолжает расти, но колонии становятся непрозрачными, шероховатыми. Культуры *F. necrophorum* хорошо растут на мозговой среде с добавлением 0,05% сернокислого железа, при этом наблюдается почернение среды за счет образования сероводорода.

*F. necrophorum* обладают выраженной биохимической активностью: ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, арабинозу, галактозу, левулезу, мальтозу, сахарозу, салицин, немного слабее лактозу. Часть штаммов пептонизирует молоко; желатин и свернутую сыворотку не разжижает. Образует индол и сероводород, не восстанавливает нитраты в нитриты. *F. necrophorum* патогенны для мышей и кроликов.



Рис. 3. Некротическое расплавление тканей конечности у мыши при экспериментальном заражении *F. necrophorum*



Рис. 4. Абсцессы у кролика при экспериментальном заражении *F. necrophorum*

По антигенным свойствам принято различать четыре серотипа возбудителя, однако ввиду отсутствия коммерческих диагностических наборов подтвердить это не представляется возможным. Считается, что наиболее вирулентными из описанных серотипов являются А и АВ.

Таблица 1.

№№	Признак	Серотиповая принадлежность			
		A	AB	B	C
1	Гемагглютинация куриных эритроцитов	+	+—	—	—
2	Гемолиз	+	+	+	—
3	Патогенность для белых мышей	+++	++	+	—
4	Быстрая седиментация при росте на жидких питательных средах	+	+—	+	—

Возбудитель болезни слабоустойчив к воздействию различных факторов внешней среды. При воздействии на материал прямых солнечных лучей *F. necrophorum* погибает через 8–12 часов, в почве летом сохраняется до 30 дней, зимой до 60 дней, в навозе также до 30–60 дней, в воде и моче — 15 дней, патологическом материале — 25–35, гное — 95–115 дней. При хранении чистых культур при температуре 2–6°C под вазелиновым маслом в 20% глицерине — до 35 дней, в 30% глицерине — до 110 дней. С молоком возбудитель не выделяется, но при попадании живет в нем до 35 дней. К воздействию физико-химических факторов и дезинфицирующих веществ *F. necrophorum* неустойчив и погибает при высушивании за 1–2 дня, при замораживании — за 25–50 дней, при нагревании до 60–80°C — 5–30 мин., при 100°C — мгновенно, под воздействием 45% спирта — 20 мин., 70% — 10 мин., 96% — 5 мин., лизола 1–5% — 5–20 мин., дегтя 2,5% — 20 мин., креолина 2,5% — 20 мин., 0,5% — 30 мин., марганцево-кислого калия 1% — 10 мин., фенола 1,5% — 5–10 мин., 2% —

2 мин., едкого натрия 1% — 20 мин., 5% — 10 мин., хлорной извести — 30–60 мин., риванола 1:100 — 15 мин., 1: 250 — 3 часа, формалина 1% — 20 мин., 2,5% — 10–15 мин. Использование перечисленных средств для дезинфекции помещений и обработ-

ки копыт животных помогает достичь хорошего результата в борьбе с некробактериозом у крупного рогатого скота.

**Эпизоотология.** Некробактериозом болеют многие виды домашних и диких животных, но степень восприимчивости к заболеванию неодинакова. Условно можно разделить её так: КРС > северные олени > овцы > кролики > куры > другие виды животных. Заболевание может проявляться в различных формах, что также зависит от вида и возраста животных.

Источником возбудителя инфекции являются больные животные и бактерионосители, которые выделяют возбудитель в окружающую среду с калом, мочой, слюной, экскретами, гноем из очагов некроза на коже и т.д. Факторами передачи возбудителя являются инфицированные пастибища, полы, подстилка, предметы ухода.

Заражение происходит через инфицированные объекты окружающей среды при травмировании кожи, слизистых, при патологических родах. Возможен аутогенный путь заражения, поскольку *F. necroforum* длительное время может персистировать в желудочно-кишечном тракте жвач-

ных, не вызывая каких-либо патологических процессов. Первичный занос инфекции в хозяйство происходит, как правило, вместе с больными или инфицированными животными, чаще племенными нетелями или откормочными бычками. В случае отсутствия системы мероприятий по предотвращению распространения болезни инфекция приобретает на ферме стационарный характер с тенденцией к усилению тяжести патологического процесса вследствие многократного пассажа возбудителя через естественно-восприимчивых животных. У крупного рогатого скота вспышки заболевания могут наблюдаться в любое время года, тогда как у других животных, например северных оленей, четко выражена весенне-летняя сезонность.

Возникновению и распространению инфекции способствуют различные предрасполагающие факторы, к которым можно отнести снижение резистентности организма на фоне несбалансированного кормления и неудовлетворительных условий содержания, минеральное голодание, паразитарные и инфекционные болезни, травмы, раны, хирургические операции и т.д. Вспышки заболевания чаще проявляются в дождливую холодную погоду, вызывающую макерацию кожи копытец, а также при наличии технологических нарушений, таких как короткие стойла, щелевые полы, отсутствие подстилки.

**Патогенез.** При попадании возбудителя в организм восприимчивого животного в месте проникновения, как правило, развивается патологический очаг, нарушаются трофики тканей и поступление в них кислорода. Размножаясь в омертвевших тканях, *F. necrophorum* вырабатывает экзо- и эндотоксины, в частности лейкоцидин, уничтожающий лейкоциты и ма-

крофаги, а также некротоксин, гемолизин, цитоплазматический токсин, лецитиназу, гиалуронидазу и пр., что способствует гнойно-некротическому поражению тканей. Из первичного очага возбудитель распространяется с током крови, образуя во внутренних органах вторичные некротические очаги, и способствует развитию бронхопневмоний, плевритов, перитонитов, абсцессов, флегмон и пр. При осложнении патологического процесса вторичной гноеродной микрофлорой болезнь принимает злокачественный характер.

**Клинические признаки.** Инкубационный период при некробактериозе составляет от 3 до 8 дней, иногда больше. Разделяют три формы болезни, которые могут протекать остро, подостро и хронически.

У крупного рогатого скота наиболее распространенной формой некробактериоза является поражение конечностей, обычно задних. Болезнь проявляется хромотой, залеживанием, снижением массы тела и молочной продуктивности. При осмотре пораженного копыта обнаруживают покраснение, отечность, язвы. В более запущенных случаях выявляются гнойные поражения в области венчика и межкопытцевой щели, роговых наружных стенок копытец, кровоточащие раны, свищи, поражения суставных капсул, сухожилий, костей. Процесс сопровождается резко выраженной болезненностью. Процесс может подниматься выше, вызывая флегмоны и поражения вышележащих суставов вплоть до тазобедренного. У заболевшего животного температура тела может повышаться до 40–42°C или оставаться в норме. Болеют взрослые продуктивные коровы, у молодняка копытная форма некробактериоза встречается редко.



Рис. 5. Антисанитарные условия содержания способствуют распространению некробактериоза

Молодые животные в большей степени подвержены кожной форме некробактериоза. При этом, как правило, на фоне каких-либо вирусных инфекций происходит поражение кожи шеи, туловища, вымени и слизистых оболочек — носа, десен, языка, гортани, трахеи, желудочно-кишечного тракта в виде дифтеритического налета и некротических язв.

Некробактериоз внутренних органов проявляется образованием абсцессов печени, гнойно-некротическими пневмониями, плевритами, сепсисом. Болеют телята 20–50-дневного возраста, что говорит о заражении в первые дни жизни. Поражение паренхиматозных органов протекает тяжело и, как правило, сопровождается смертью, но в большинстве случаев диагноз устанавливается при патологоанатомическом вскрытии. Видимых изменений, кроме повышения температуры тела и угнетения, обычно не наблюдается.

Любая форма болезни может иметь как доброкачественное, так и злокачественное течение. При благоприятном развитии патологический процесс постепенно затухает, первичный некротический очаг инкапсулируется и животное выздоравливает. При неблагоприятном течении ограниченные очаги инфекции переходят в разлитые формы, развивается сепсис и интоксикация организма, что приводит к летальному исходу.

При патологоанатомическом исследовании наиболее выраженные изменения при некробактериозе обнаруживаются на коже и слизистых оболочках. Трупы животных, павших от некробактериоза, истощены. Слизистая оболочка языка, губ, щек, глотки, гортани отекшая с фибринозными наложениями грязно-серого цвета, под которыми находятся язвы с утолщенными краями и неровным дном. Пленки плохо отделяются, крошатся при прикосновении и плохо пахнут. Нередко имеет место поражение костей и хрящей гортани, при этом костная ткань превращается в рыхлую массу серого цвета и легко крошится. Также некротические поражения (язвы, покрытые густым гноем) обнаруживаются в рубце и сетке, реже в кишечнике и матке.

При некробактериозе конечностей поражения в виде язв, свищей, нагноений, некротизированных участков кожи, мышц, сухожилий и иногда костей локализуются в основном в области венчика, подошвы и межкопытцевой щели. В печени и легких, реже в селезенке, почках, вымени, миокарде и головном мозге обнаруживаются единичные или множественные абсцессы, наполненные желтовато-серым гноем или сухой массой такого же цвета различного размера. Печень увеличена в два—три раза.



Рис. 6. Обусловленное *F. necrophorum* воспаление кожи в области венчика и межкопытцевой щели



Рис. 7. Поражение мякишем копытец у КРС при некробактериозе

**Диагностика.** Диагноз на некробактериоз устанавливают комплексно. При этом учитывают эпизоотологические данные, данные клинических и патологоанатомических исследований и результаты бактериологического исследования. Лабораторную диагностику с целью подтверждения некробактериоза проводят в соответствии с методическими указаниями, утвержденными ГУВ МСХ СССР 01.06.1987 г.

Постановка диагноза обычно занимает не менее 15 дней, поскольку подтвержденным диагноз считается при выделении чистой культуры из материала или от животного, погибшего после постановки биологической пробы, что занимает достаточно много времени.

Для подтверждения видовой принадлежности микроорганизма используют диагностические тест-системы, например АНАЭРО-тест (ф. Окскоид), и современные методы — Maldi Tof и полимеразную цепную реакцию.

**Дифференциальный диагноз.** Некробактериоз необходимо дифференцировать от ящура, вирусной диареи, вези-

кулярного стоматита, злокачественной катаральной горячки, контактизной плевропневмонии, дерматофилеза, нодулярного дерматита.

**Лечение.** Заболевших животных изолируют и лечат, при этом чем раньше будет начато лечение, тем вероятнее получение положительного результата. При индивидуальных методах лечения проводят хирургическую обработку ран, тщательно удаляя некротизированные ткани, после чего обрабатывают дезинфицирующими и антимикробными средствами (3%-ный раствор перекиси водорода, 0,2%-ный раствор марганцовокислого калия, раствор фурацилина 1:5000 и др.). Из антибиотиков для лечения некробактериоза применяют левомицетин, тетрациклин, эритромицин, тилазин, энрофлоксацин, при этом они могут быть использованы как инъекционно, так и местно в виде порошков, растворов или спреев. Не стоит забывать, что ввиду приобретающей все большее распространение антибиотикорезистентности микроорганизмов предварительно проводят определение чувствительности выделенной культуры к антимикробным препаратам, иначе результаты лечения могут быть непредсказуемы. Для группового лечения используют ножные ванны, установленные в проходах поперек движения животных при выгоне. В качестве дезинфицирующего раствора в ваннах применяют 10%-ный водный раствор сульфата цинка или «Цинкосол». Обработка должна проводиться один раз в 7–10 дней. Преимущество данного препарата состоит в том, что он глубоко проникает в ткани копыт, длительно сохраняет свою активность, при этом не разрушает живые ткани. В качестве альтернативы могут быть использованы 10%-ный раствор медного купороса или раствор формалина с концентрацией 5–7%.

**Меры борьбы.** При подтверждении диагноза на неблагополучном предприятии вводятся ограничения и проводятся мероприятия, регламентированные «Правилами по профилактике и ликвидации некробактериоза животных» от 11.06.2000 г. № ВП 13.4.1313-00.

**Профилактика.** Борьба с некробактериозом животных может быть только комплексной, при этом важно не только воздействовать на возбудителя инфекции, но также обеспечивать повышение общей резистентности организма животных. Повышению устойчивости к заболеванию способствуют сбалансированное кормление качественными кормами, соблюдение зоогигиенических норм содержания, обеспечение активного моциона.

Важным звеном профилактики заболевания является своевременное выявление и лечение болезней, сопровождающих отёлы, — маститов и эндометритов, которые значительно чаще встречаются у больных некробактериозом коров. Необходима функциональная обрезка копытец животных по мере отрастания копытцевого рога (желательно 2 раза в год).

Обязательными элементами профилактики некробактериоза являются дезинфекция помещений и санация пастбищ. Дезинфекцию проводят в период нахождения животных на пастбищах и выгулах, предварительно тщательно очистив поверхности от навоза и других органических загрязнителей. Если нет возможности удалить всех животных из помещения, помещения дезинфицируют частями, переставляя животных в другие группы. Для обработок обычно используют 3% горячий раствор едкого натрия, 3% раствор формалина, а также комплексные дезинфектанты, например Дезолайн-Ф. Периодичность дезинфекции составляет не менее одного раза в 7–10 дней. Навоз обеззараживают биотермически.

Санацию пастбищ целесообразно проводить путем самоочищения, например, в течение зимнего периода года. В летний сезон после выпаса больного скота выдерживают периоды 15–30 дней в зависимости от погодных условий. В сухую солнечную погоду возбудитель болезни погибает на пастбище быстро. Рыхление почвы при посеве трав на культурных пастбищах также способствует их обеззараживанию.

Одним из наиболее часто применяемых и эффективных способов профилактики и лечения некробактериоза являются ножные ванны.

Для ножных ванн целесообразно применять 10% раствор сульфата цинка или меди. Конструкция ванн может быть различной, но основные принципы их использования следующие: ванны должны изготавливаться из инертного для данного вещества материала, наиболее целесообразно применять бетон высоких марок (400–500); ванны должны быть оборудованы настилами из дерева для предохранения разрушения материала и травматизма животных, а также иметь систему слива отработанного раствора в специальный сборник; глубина заливаемого в ванну раствора должна быть не менее 25 см, чтобы полностью обрабатывалось большое копытце; целесообразно (с точки зрения снижения трудоемкости обработок) устраивать ванны в проходах, тамбурах, а также по ходу движения животных при активном моционе, ограниченные расколом. Для повышения результатов обработок целесообразно использовать двухсекционные, соединенные ножные ванны. Первая ванна — с водой для мойки копытец и снижения загрязнения дезраствора и вторая ванна — с дезраствором. Для повышения эффекта воздействия цинка или меди в первую ванну с водой полезно добавлять 0,2–0,5% раствор моющего, поверхностно-активного средства: сульфанола, де-

змола, порошков для мойки доильной аппаратуры и т.д. Эти вещества можно добавлять и непосредственно в указанные растворы солей. Воду в моющей ванне следует менять перед каждым использованием, а дезрастворы — по мере их загрязнения. Желательно, чтобы животное находилось в ножной ванне не менее нескольких минут при каждой обработке: чем длительнее экспозиция дезраствора, тем выше эффективность ножных ванн.

В зимнее время при отрицательных температурах можно применять т.н. сухие ванны, в частности порошок сульфата меди (медного купороса) в смеси с гашеной известью в соотношении 1:9, что значительно проще, чем использование горячей воды для ванн, или оборудовать ванны в теплом помещении.

**Иммунитет и специфическая профилактика.** При переболевании у животных образуется нестойкий и непродолжительный иммунитет, поэтому часто они могут заболевать повторно. Также длительно ведутся споры о возможности индуцирования искусственного иммунитета при вакцинации восприимчивого поголовья, при этом единого мнения нет до сих пор, хотя установлено, что введение цельноклеточных препаратов не обеспечивает у животных напряженного иммунитета.

В нашей стране для предотвращения вспышек некробактериоза используют инактивированные вакцины, изготовленные на основе эндотоксинов возбудителя. Зарегистрировано пять таких препаратов, отличающихся по антигенному составу и адьювантам, в связи с чем вакцинация проводится либо путем подкожного, либо внутрикожного введения. Применение вакцин обеспечивает образование высокого титра антител к возбудителям некробактериоза и существенно снижает количество новых случаев заболевания животных в стаде. Но вместе

с тем все производители вакцин против некробактериоза отмечают, что эффективность иммунизации может быть заметна лишь при комплексном подходе к борьбе с некробактериозом: должно быть обеспечено полноценное кормление, высокое санитарное состояние помещения, своевременная расчистка копыт, применение ножных ванн, предотвращение травмирования копытца и т.д. Обеспечить стойкое благополучие хозяйства и оздоровить хозяйство только применением вакцин удается в очень редких случаях.

ООО «Ветбиохим» для специфической иммунизации крупного рогатого скота против некробактериоза выпускает вакцину «Унговак». Препарат изготовлен из эндотоксинов возбудителя некробактериоза, в качестве адьюванта используется уникальная композиция полисахаридов, обеспечивающая формирование стойкого иммунитета сроком не менее 6 мес., для индуцирования которого животных иммунизируют трехкратно путем внутрикожного введения малых доз препарата.

## Литература

- Гюлюкин М.И., Караваев Ю.Д., Семенова И.Н., Мельник Н.В. Комплексная система мероприятий при некробактериозе животных. Ветеринария. 2007; 9: 19–23.
- Жиров В.А., Соломаха О.И., Булгаков Р.И., Пилипенко А.А. Специфическая профилактика некробактериоза северных оленей. Науч. — техн. бюл. НИИСХ Крайнего Севера. 1988; 3–4: 17–20.
- Искандарова С.С., Федоров А.И., Искандаров М.И., Гюлюкин М.И. Разработка, изучение и применение защитно-профилактического средства на основе лантаноидов для профилактики

мастита и защиты кожных покровов животных от неблагоприятных факторов внешней среды. В книге: Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск: СиБАК, 2019; 206–225.

4. Караваев Ю.Д., Семенова И.Н., Мироненко А.К., Мельник Н.В., Пышкина Т.Н., Скичко Н.Д., Елисеева Л.А. Иммуногенность различных компонентов бактериальной клетки возбудителя некробактериоза. Науч. основы пр-ва вет. биол. препаратов. Щелково. 2000; 157–158.

5. Караваев Ю.Д., Семенова И.Н., Мельник Н.В., Мачахтыров И.Г., Аникеев М.А., Мироненко А.К. Опыт борьбы с некробактериозом животных. Ветеринария. 2003; 7: 7–8.

6. Лопатин С.В., Самоловов А.А. Применение комплексной системы мероприятий при некробактериозе животных в ОАО «Бурлинский» и ее экономическая эффективность. Актуальные вопросы ветеринарной медицины. Новосиб. гос. аграр. ун-т. 2005; 141.

7. Лопатин С.В., Самоловов А.А. Эффективность оздоровительных мероприятий при болезнях копытец крупного рогатого скота. Ветеринария. 2015; 9: 23–27.

8. Магерова Т.М., Самоловов А.А., Лопатин С.В. Распространение абсцессов печени у крупного рогатого скота в Новосибирской области и роль *F. necrophorum* в их этиологии. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2005; 2: 15–19.

9. Меньшенин В.В., Лавченко Е.Г., Соломаха О.И., Бондаренко Е.И. Питательные среды для промышленного культивирования *F. necrophorum*. Ветеринария. 1997; 3: 27–28.

10. Панаюк С.Д. Значение ассоциаций микроорганизмов в этиологии и

профилактике инфекционных болезней конечностей крупного и мелкого рогатого скота (некробактериоз, копытная гниль). Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М., 2007; 51.

11. Панаюк С.Д., Сидорчук А.А., Баусина В.Л., Устинова Г.Н. Экспериментальное подтверждение значения ассоциаций микроорганизмов в этиологии инфекционных заболеваний конечностей сельскохозяйственных животных. Сб. науч. тр. ВГНКИ. 2005; 65: 205–212.

12. Панаюк С.Д., Кириллов Л.В., Сидорчук А.А., Устинова Г.И., Кононов А.Н., Сурмило А.П., Геладзе В.Ш., Арутюнова С.С. Специфическая профилактика инфекционных заболеваний конечностей крупного рогатого скота и овец в Российской Федерации (*Bacteroides nodosus* и *Fusobacterium necrophorum*). Сб. науч. тр. ВГНКИ. 2005; 66: 265–279.

13. Панаюк С.Д., Сидорчук А.А., Алексеева С.В., Устинова Г.И., Кононов А.Н., Геладзе В.Ш. Ассоциированные вакцины «Нековак» и «Овикон» в системе мероприятий по профилактике и борьбе с инфекционными болезнями конечностей крупного и мелкого рогатого скота. Ветеринария. 2010; 8: 7–10.

14. Самоловов А.А., Магерова Т.М., Лопатин С.В. Способ оценки эпизоотической ситуации по некробактериозу крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах. Сборник научных трудов, посвященный 70-летию ДальЗНИИ. 2005; 91–94.

15. Самоловов А.А., Лопатин С.В. Болезни копытец коров — владелец животных центральный фактор проблемы. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию Урал. гос. акад. ветеринар. медицины и 100-летию дня рождения д-ра ветеринар. наук, проф. В.Г. Мартынова. Секция 1. Юж.-Урал. гос. аграр. ун-т. 2015; 48–52.

16. Сидорчук А.А., Кириллов Л.В., Панасюк С.Д., Соломаха О.И., Караваев Ю.Д., Семенова И.Н. Проблемы борьбы с некробактериозом: заблуждения и реальность. Ветеринария. 2006; 2: 5–6.
17. Сидорчук А., Воронец А. Некробактериоз КРС: бояться или бороться? Животноводство России. 2001; 12: 32–33.
18. Сидорчук А.А., Кириллов Л.В., Панасюк С.Д., Соломаха О.И., Караваев Ю.Д., Семенова И.Н. Проблемы борьбы с некробактериозом: заблуждения и реальность. Ветеринария. 2006; 2: 5–6.
19. Соломаха О.И., Кириллов Л.В., Мельшенин В.В., Лавченко Е.Г., Жиров В.А. Профилактика некробактериоза животных. Ветеринария. 1997; 5: 15–17.
20. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Белименко В.В., Гулюкин М.И. Анализ и оценка риска возникновения вспышек природно-очаговых зооантропонозных инфекций с использованием геоинформационных технологий. Методическое пособие. М.: Агентство творческих технологий, 2018; ISBN 978-5-990689-8-3, DOI 10.30917/ATT-PRINT-2018-2.
21. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Белименко В.В. Эпизоотологический надзор и мониторинг в условиях мегаполиса // Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск: СибАК, 2019; 167–184.
22. Amoako K., Goto Y., Shinjo T. et al. Studies on the factors affecting the hemolytic activity of *Fusobacterium necrophorum*. Veterinary Microbiology. 1994; 41(1–2): 11–18.
23. Abe P.M., Holland J.W., Stauffer L.R. Immunization of mice against *Fusobacterium necrophorum* infection by parenteral or oral administration of vaccine. Am. J. Vet. Res. 1978; 39(1): 115–118.
24. Amoako K., Goto Y., Xu D. et al. The effects of physical and chemical agents on the secretion and stability of a *Fusobacterium necrophorum* hemolisins. Veterinary Microbiology. 1996; 51(1–2): 115–124.
25. Berg J.N., Scanlan C.M. Studies of *Fusobacterium necrophorum* from bovine hepatic abscesses: biotypes, quantitation, virulence, and antibiotic susceptibility. Am. J. Vet. Res. 1982; 43(9): 1580–1586.
26. Brazier J.S., Citron D.M., Goldstein E.J. A selective medium for *Fusobacterium* spp. J. Appl. Bacteriol. 1991; 71(4): 343–346.
27. Coyle-Dennis J.E., Lauerman L.H. Biological and biochemical characteristics of *Fusobacterium necrophorum* leucocidin. Am. J. Vet. Res. 1978; 39(11): 274–276.
28. Garcia M.M., Alexander D.S., McKay K.A. Biological characterization of *Fusobacterium necrophorum*. Cell fractions in preparation for toxin and immunization studies. Infection and Immunity. 1975; 11(4): 609–616.

# ИНФЕКЦИОННЫЕ МАСТИТЫ У КОРОВ

*Капустин А.В., Иванов Е.В.*

**Актуальность.** Молочное животноводство является одной из основных отраслей сельского хозяйства. Заболевания крупного рогатого скота, особенно лактирующих коров, тормозят развитие отрасли. Значительную часть в структуре заболеваний коров занимают маститы, являющиеся одной из нерешённых проблем, снижающих темпы роста молочно-головного животноводства. Заболевание может возникнуть в любое время года, в различные периоды лактации коров и сопровождается снижением продуктивности и репродуктивных функций животных и дальнейшей их выбраковкой. Мастит влияет не только на здоровье животных, но и на рентабельность молочных ферм за счет прямых потерь продуктивности, выбраковки животных, недополучения приплода, затрат на лечение и профилактику заболевания, а также уничтожения молока, содержащего различные антибиотикные препараты, применяемые для лечения. Еще одним аспектом маститов является высокое содержание соматических клеток в молоке, что значительно снижает технологические свойства продукта. В настоящее время для лечения и профилактики маститов разработано и внедрено в практику огромное количество различных лекарственных препаратов, имеющих как преимущества, так и недостатки.

Воспаление молочной железы может быть вызвано механическими, термическими, химическими и биологическими факторами [8]. При любой из форм мастита пораженные доли вымени увеличены, горячие, болезненные при пальпации, отмечается увеличение, уплотнение и неподвижность надвымянных лимфузлов. При отсутствии эффективного и

своевременного лечения резко снижается молокоотдача, происходит запустение или атрофия пораженных долей молочной железы, что ведет к выбраковке животного.

Для снижения экономических потерь, вызванных маститами, важно раннее диагностирование и лечение. В связи с тем, что возбудители маститов всегда находятся на коже вымени, одним из аспектов профилактики является соблюдение санитарно-гигиенических мероприятий [8, 9, 10].

Имеется множество литературных данных, свидетельствующих о том, что микроорганизмы, вызывающие субклинические маститы, могут приводить к пищевым интоксикациям у людей. Ряд авторов отмечает, что молоко, полученное от маститых коров, приводит к стафилококковым и стрептококковым инфекциям у людей (ангина, скарлатина, отиты, рожа). У больных маститом коров уменьшается количество лактозы, казеина, жира в молоке, снижается его плотность и способность к свертыванию. Отмечена роль микроорганизмов в этиологии заболеваний верхних дыхательных путей, пневмоний, септических процессов, менингитов, заболеваний кожи (стрептодермия) и мочевыводящих путей у людей, употреблявших молоко от коров, больных скрытым маститом.

**Этиология.** На раннем этапе исследований возникновение маститов связывали в основном с физическими факторами, например холодом или механическими травмами. В 1876 г. была выдвинута гипотеза об инфекционной природе мастита у коров. Но основные возбудители, вызывающие маститы, были выявлены только в сороковых го-

дах двадцатого века. В настоящее время насчитывается более 200 видов возбудителей, способных вызывать воспаление молочной железы [28, 29].

В этиологии маститов у коров наибольшее значение имеет комплекс разнообразных внешних и внутренних факторов, таких как механические (нарушение технологии доения, несбалансированность работы доильных установок, неудовлетворительная подготовка вымени), физические (воздействие высоких или низких температур и др.), химические (раздражающие вещества), генетические (неправильная форма вымени, тугодойность и др.), биологические (бактерии группы кишечной палочки, стрептококки, сальмонеллы, микоплазмы, стафилококки, ящур, актиномикоз, туберкулез, простейшие грибы).

Бактерии, вызывающие мастит, присутствуют практически на любой поверхности, с которой контактирует корова [24, 26]. Особенно часто их присутствие обнаруживается на коже вымени, а также в секрете молочной железы. При проведении комплексного микробиологического анализа одновременно выявляется ряд культур (стафилококки, стрептококки, эшерихии, клебсиеллы, коринебактерии, синегнойная палочка, микобактерии, листерии, кандиды, микоплазмы, возбудители инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и др.), усиливающих патогенное действие друг друга. Как правило, в 75–90% проб присутствуют патогенные стафилококки и стрептококки. Наиболее опасным возбудителем маститов признан *Staphylococcus aureus*, способный вызывать острый, подострый, хронический, гангренозный и субклинический маститы. Также часто этиологическую роль играют *Staphylococcus epidermidis*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. scirimi*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* и *S. hyicus*.

Стрептококковые маститы наиболее часто вызываются видами *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* и *S. uberis*, реже этиологическое значение имеют другие широко распространенные виды — *S. pyogenes*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. equi*, *S. acidominutus*, *S. parauberis*. Воспаление молочной железы, вызываемое *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella spp.*, чаще встречается у овец, чем у крупного рогатого скота. *Nocardia spp.*, *Serratia spp.*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* являются сапрофитными микроорганизмами, которые спорадически вызывают острый геморрагический мастит, поражая единичных животных.

Одним из наиболее часто встречающихся возбудителей инфекционных маститов является *Escherichia coli*. Вызванные ими маститы могут иметь острое или подострое течение и характеризуются повышением температуры, водянистым секретом, снижением молокоотдачи. Кроме того, мастит иногда может вызываться *Clostridium perfringens* типа А [27, 31, 21, 33, 34].

Вирусы могут быть как предрасполагающим, так и вызывающим фактором при мастите крупного рогатого скота (ящур, вирус инфекционного ринотрахеита, парагриппа) [32].

При установлении причин, приведших к возникновению мастита, следует исходить из того, что в каждом случае действует не один, а комплекс болезнетворных факторов, таких как климатические условия, аномальные развития вымени, продуктивность, предрасположенность к заболеваниям (задержание последа, интоксикация, атония преджелудков, эндометриты, болезни конечностей, отравления нитратами, карбамидом, нитритами и др.). Коровы наиболее подвержены развитию маститов в течение 10 дней до и после отела.

Существенную роль в этиологии мастита играет кормление. По сообщению

ряда ученых, кормление дойных коров кукурузным силосом с повышенным содержанием масляной кислоты повышает частоту возникновения инфекционных маститов на 10%. Увеличение в рационе мочевины снижает бактерицидную активность крови. Содержащиеся в большом объеме в клевере и других кормовых культурах фитоэстрогены подавляют механизмы фагоцитоза, и вследствие этого снижается резистентность молочной железы к болезнестворному воздействию патогенов.

**Патогенез и клинические признаки.** В соответствии с классификацией А.П. Студенцова по виду воспаления и течения маститы могут быть серозными, катаральными, фибринозными, гнойными, гноино-катаральными, геморрагическими. При неблагоприятном течении могут развиваться абсцесс и флегмона вымени. Воспалительные процессы в молочной железе могут переходить из одной формы в другую либо принимать смешанный характер. В связи с этим маститы различают по проявлению заболевания: клинически выраженные и скрытые (субклинические), а также по течению болезни: острый, подострый и хронический.

Патогенез мастита имеет ряд особенностей, связанных с наличием большого количества кровеносных и лимфатических сосудов вымени, и включает в себя следующие этапы: нарушение нервной проводимости и регуляции в тканях, нарушение нейрогуморального контроля работы молочной железы со стороны гипоталамуса, щитовидной железы, гипофиза; переход нервных элементов в состояние парабиоза вследствие болевых, термических, химических, токсических раздражений; воздействие токсических продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, таких как ацетилхолин, креатинин, гистамин, молочная кислота и др. Всё это приводит к нарушению био-

химических процессов, на фоне которых воспаление развивается параллельно экссудативными, пролиферативными и альтернативными путями. В состав экссудата входят клетки крови и эпителия. В зависимости от их соотношения различают экссудат серозный, гнойный и геморрагический. Пролиферативный процесс проявляется бурным размножением клеток мезенхимы, соединительнотканых элементов, эндотелия сосудов. В ответ на первичную травму возникает альтерация, нарушение питания, структуры, функции тканей и обмена веществ. Соединительная ткань образуется взамен разрушенных структур молочной железы. Вначале дистрофический процесс развивается в очаге травмы, но в дальнейшем, по мере нарастания процесса, происходит отмирание различных клеточных элементов, что приводит к снижению молочной продуктивности или полной агалактии. При острой форме в секрете преобладают нейтрофилы и гистиоциты, в хронических случаях — плазматические и лимфоидные клетки. Внешне это проявляется отеком и уплотнением воспалительного очага [30].

В механизме развития мастита важное место занимает общий и местный иммунитет. Устойчивость вымени зависит от состояния соскового канала, степени клеточных и гуморальных факторов защиты, строения и формы вымени. У больных маститом и эндометритом коров отмечается повышение в сыворотке крови триптофана, гликогена, аргинина и снижение серина, валина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, резервной щелочности.

В зависимости от тяжести воспалительного процесса в тканях вымени происходят различные морфоструктурные нарушения. Утолщение стенки соска, наличие в слизистой папилломатозных разрастаний; инфильтрация экссудатом междольковой и межаль-

веолярной соединительной ткани; расширение либо сдавливание экссудатом кровеносных и лимфатических сосудов. Дальнейшее вовлечение альвеол и молочных ходов приводит к изменению объема и качества секрета, который становится водянистым, появляется голубоватый оттенок.

При катаральном мастите за счет выраженного отека происходит сдавливание клеток альвеол окружающими тканями, что ведет к их перерождению. Происходит расширение кровеносных и лимфатических сосудов, секрет приобретает желтовато-серый оттенок и содержит значительное количество сгустков и хлопьев.

При остром гноиного-катаральном воспалении молочной железы отмечается сильная гиперемия выводящих слизистых путей, инфильтрация соединительной ткани вымени клеточными элементами, сильное расширение кровеносных и лимфатических сосудов вокруг альвеол. Экссудат имеет сметанообразную консистенцию.

Микроорганизмы проникают в молочную железу несколькими путями, а именно галактогенным, гематогенным, лимфогенным. Источником микрофлоры являются пол, подстилка, вода, руки персонала и различные предметы. Неправильное доение, расслабление сфинктеров соска, сужение, заражение соскового канала, несоблюдение правил асептики и др. способствуют проникновению бактерий через сосковый канал. При повреждении кожных покровов, кровеносных и лимфатических сосудов, а также при воспалительных процессах, задержании последа, атонии матки из печени, почек, желудочно-кишечного тракта и других органов микроорганизмы с лимфой и кровотоком могут проникать в ткани молочной железы [14].

Следует учитывать, что один и тот же микроорганизм может вызвать любую форму мастита, а тяжесть течения зависит от вирулентности возбудителя и устойчивости организма животного.

По течению острый мастит длится до 10 дней, подострый до 3 недель и хронический более месяца. В последнее время в связи с широким применением антибиотиков преобладающее место занимает субклинический мастит. Произошла искусственная эволюция бактерий, в результате чего некоторые формы мастита протекают с менее выраженными клиническими признаками, а также возросла роль грибов в развитии маститов.

При серозном мастите, часто возникающем в первые дни после отела, происходит пропитывание межальвеолярной и междольчатой соединительной ткани и подкожной клетчатки экссудатом. Отмечается снижение аппетита, угнетение, незначительное повышение температуры тела. Поражается одна или две четверти, реже все вымя. Пораженные доли вымени увеличены, плотной консистенции, горячие, болезненные, соски отечные. Также увеличены поверхностные паховые лимфоузлы. Животные малоподвижные, наблюдается повышение температуры и снижение аппетита. Появление в секрете молока хлопьев казеина, гноя говорит о переходе мастита в катаральную либо гнойную форму. При своевременном лечении и при оптимальных условиях содержания через 5–7 суток происходит выздоровление.

При катаральном мастите в воспалительный процесс вовлекаются цистерны, железистый эпителий альвеол и молочные ходы. У животного отмечается снижение аппетита, угнетение, повышение температуры тела. Сгустки казеина закупоривают молочные протоки, что ведет к появлению очаговых

уплотнений. При сдавливании первые порции секрета содержат хлопья, затем идет нормальное молоко.

При катаральном мастите меняется состав молока, оно становится водянистым, с примесью хлопьев, имеет серовато-желтый цвет. Пораженные доли вымени увеличиваются в объеме, при этом после доения объем доли уменьшается слабо. Отмечается незначительное повышение температуры тела.

При подостром катаральном мастите наблюдается обильное отделение мутного секрета серого цвета. Уплотнения в пораженной доле наблюдаются редко. При хроническом катаральном мастите количество отделяемого за один раз секрета может достигать 200 мл, он густой, от кремового до шоколадного цвета, возможны примеси крови и слизи. При своевременном выявлении и лечении завершается почти полным восстановлением функции органа через 6–9 суток.

Развитие фибринозного мастита обусловлено наличием колiformных бактерий. Стенки кровеносных сосудов вымени становятся проницаемыми для фибриногена, который под действием ферментов превращается в фибрин. Происходит нарушение трофики тканей, вследствие чего возникают очаги некроза. Отмечается отказ от корма, мышечная дрожь, гипотония преджелудков, значительное увеличение в объеме пораженной части вымени, уплотнение консистенции. Процесс сопровождается отечностью, гиперемией сосков, болезненностью при пальпации, может наблюдаться крепитация. Также увеличены и болезненны наружные паховые лимфатические узлы. Секрет с примесью фибрина, мутный, соломенно-желтого цвета.

При гнойном мастите происходит инфильтрация тканей молочной железы с перерождением лейкоцитов в

гной. При поражении молочных ходов, цистерн и железистого эпителия альвеол экссудат выпотевает на поверхность, что приводит к гноино-катаральному маститу. Если вовлекается межальвеолярная и междольковая соединительная ткань, то может развиться абсцесс или флегмона. Гноино-катаральный мастит ведет к отказу от корма, повышению температуры тела, снижению удоя или наступлению агалактии, отмечается учащение пульса и дыхания. Пораженные четверти вымени увеличены в объеме, болезненные и отечные. Поверхностные паховые лимфатические узлы увеличены. Из пораженной доли при выдаивании выделяется густой, желтого или белого цвета секрет с хлопьями, при этом пораженная доля не уменьшается в объеме.

При абсцессе вымени пораженная четверть увеличена неравномерно. Отмечается отечность, болезненность пораженной доли вымени. Поверхностные паховые лимфоузлы увеличены в размерах. Снижено количество секрета серо-белого либо желтого цвета, с примесью гноя, крови, казеина.

Разлитое гноевое воспаление подкожной клетчатки и соединительной ткани, сопровождающиеся признаками септицемии, называется флегмоной. Флегмона быстро осложняется гангреной, в случае своевременного лечения в паренхиме остаются участки индурации тканей, что приводит к потере продуктивности. Наблюдается болезненность поверхностных паховых лимфоузлов, выделяющийся секрет водянистый с примесью хлопьев.

Мастит, вызванный возбудителем ящура, проявляется поражениемслизистых оболочек и кожи. Первоначально появляются единичные или множественные пузыри с прозрачным содержимым. Через несколько дней

афты вскрываются и зарастают эпителием. При дальнейшем развитии патологического процесса происходит поражение паренхимы, что приводит к резкому снижению продуктивности.

При актиномикозе вымени у крупного рогатого скота появляются незаживающие гнойные очаги под кожей. В дальнейшем некоторые гнойники вскрываются, в результате чего образуются свищи. При этом не происходит увеличения поверхностных лимфатических паховых лимфоузлов.

При туберкулезе молочной железы отмечено отсутствие повышения местной температуры, увеличение пораженной доли вымени и поверхностных лимфоузлов. Происходит постепенное снижение продуктивности, секрет становится водянистым. *M. tuberculosis* редко проникает в вымя галактогенным путем, чаще является признаком генерализованной формы.

Гангренозное поражение вымени возникает при осложнениях других форм мастита анаэробными микрорганизмами и сопровождается повышением температуры тела, тяжелым состоянием животного, нарушением работы сердечно-сосудистой системы, пораженные ткани вымени подвергаются гнилостному распаду. При пальпации наблюдается выделение пузырьков газа. Поверхностный паховый лимфатический узел увеличен в размере, болезненный. При доении экссудат грязно-серого или бурого цвета, с гнилостным запахом.

При субклиническом мастите поражается незначительная часть тканей вымени. Протекает с серозным, катаральным, гнойным типом воспаления либо в сочетанном виде. Органолептически секрет трудно улавливается, так как разбавляется с большим количеством молока. Отсутствие лечения приводит к атрофии долей вымени.

У 10–20% животных происходит самовыздоровление, еще у 10–15% мастит проявляется какой-либо клинической формой, в оставшихся случаях процесс переходит в хроническое течение.



Рис. 1. Увеличение доли вымени при мастите

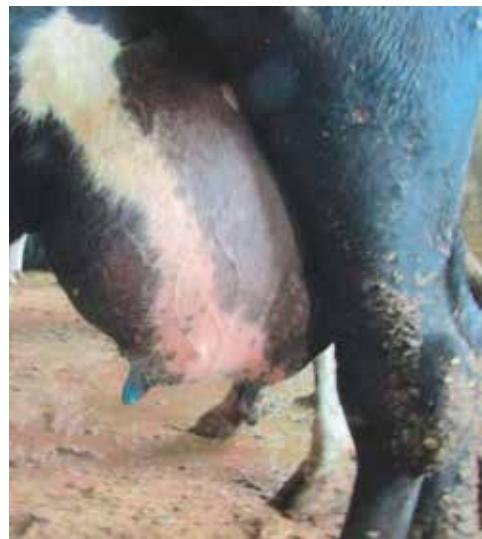


Рис. 2. Гиперемия кожи вымени при остром мастите



Рис. 3. Увеличение доли вымени при мастите

**Диагностика маститов.** Своевременное выявление маститов является приоритетной задачей ветеринарной службы, так как позволяет сохранить здоровье животных, предупредить распространение болезни на значительное поголовье, а также обеспечить получение молока высокого качества.

Для контроля распространенности в стаде субклинических маститов применяют экспресс-методы, такие как проба с димастином, мастидином, мастотестом, действие которых основано на определении количества лейкоцитов и изменения рН молока, или анализаторы типа Экотест-303. Для постановки реакций используют планшеты с четырьмя лунками объемом 1 или 2,5 мл, при этом исследуют обычно первые и последние порции сдаваемого молока.

Методы, применяемые для выявления маститов у коров, можно разделить на три группы: физико-химические, цитологические и микробиологические.

К физико-химическим методам диагностики мастита можно отнести каталазную пробу, определение плотности и электропроводимости молока, а также опсонофагоцитарную реакцию лейкоцитов молока. Из индикаторных методов часто используют определение рН. Молоко здоровых коров имеет рН 6,3–6,9, а при мастите молоко становится более щелочным (рН 7,0 и выше) и реже кислым (рН 6,0 и ниже). Следует учитывать, что кислая реакция молока бывает сразу после отела, а щелочная — у коров в конце лактации и период запуска. Действие перечисленных диагностикумов основано на взаимодействии поверхностно-активных веществ с лейкоцитами, что ведет к образованию сгустка, а добавленный индикатор изменяет цвет образца в зависимости от рН.

Для диагностики мастита в пробе с димастином используют пластинки с углублениями, пипетки на 1 мл, стеклянную палочку, 5%-ный раствор димастина, приготовленный на дистиллированной воде. В лунки вносят по 1 мл молока из каждой доли вымени (последние порции), добавляют по 1 мл 5%-ного раствора димастина и перемешивают. Молоко из пораженных долей вымени образует плотный тягучий сгусток ярко-красного цвета. Желеобразная консистенция сгустка и красный цвет свидетельствуют о подозрении на заболевание маститом. Молоко от здоровых животных остается оранжево-красного цвета и однородной консистенции.

Еще одним популярным и легковыполнимым тестом является проба отстаиванием. В пробирку вносят 10–12 мл молока и отстаивают его в течение 16–18 ч. при температуре 2–8°C. Учитывают реакцию на следующий день. В молоке коров, больных маститом, на дне пробирки образуется осадок с желтоватым или синеватым оттенком высотой 0,1 см и более, а также уменьша-

ется слой сливок. Молоко от здоровых коров осадка не образует. Если проба с отстаиванием дает сомнительные результаты, то для уточнения диагноза молоко направляют на исследование в ветеринарную лабораторию, где определяют число лейкоцитов, активность каталазы и лизоцима и проводят бактериологическое исследование.

Каталазная проба основана на принципе расщепления каталазой перекиси водорода с образованием пузырьков газа. При смешивании в пробирке пробы молока, полученного от больной маститом коровы, и раствора перекиси водорода можно в положительных случаях увидеть активное выделение пузырьков газа. При выявлении маститов путем исследования плотности молока пробы выдерживают 2 часа после выдавивания при температуре 20–25°C, затем наливают в стеклянный цилиндр и определяют плотность с использованием ареометра. У здоровых животных молоко имеет плотность 1,027 г/см<sup>3</sup> и выше, при заболевании коров маститом плотность молока обычно снижается.

Во многих странах для диагностики маститов используют приборы, измеряющие электропроводимость молока. Метод основан на изменении электропроводимости молока в связи с изменением содержания в нем ионов натрия, калия, хлора и некоторых других химических элементов.

**Цитологические методы диагностики мастита** основаны на определении в молоке количества соматических клеток, которые представлены лейкоцитами (до 85%), эритроцитами и клетками эпителия молочных протоков (15–20%). После добавления в молоко поверхностно-активных веществ при наличии значительного содержания соматических клеток образуется густая слизистая масса, что косвенно подтверждает наличие мастита. Принято счи-

тать, что в норме в 1 мл сборного молока количество соматических клеток не должно превышать 500 тыс.

В настоящее время широко применяются экспресс-тесты для диагностики маститов, которые отражают количество соматических клеток в молоке. Действующим началом являются поверхностно-активные вещества типа алкиларилсульфатов и алкиларилсульфонатов [16]. Желеобразный сгусток образуется в результате разрушения поверхностно-активными веществами мембран клеток, содержащихся в молоке. Переходящая при этом в раствор дезоксирибонуклеиновая кислота придает ему вязкость.

**Микробиологические методы диагностики мастита.** Для бактериологических исследований на мастит молоко отбирают с соблюдением правил асептики. Пробы доставляют в лабораторию и высевают на кровяной мясо-пептонный агар или селективные питательные среды. Полученные культуры бактерий идентифицируют до вида, а также подтитровывают к различным антимикробным препаратам. К основным возбудителям инфекционных маститов можно отнести *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Trueperella pyogenes* и некоторые другие. В последнее время на фоне возрастающей антибиотикорезистентности культур возрастает роль грибов, в частности рода *Candida*.

**Лечение.** Традиционное лечение и профилактика маститов основаны на использовании химиотерапевтических средств. К сожалению, повсеместное и бесконтрольное применение антибиотиков и сульфаниламидов способствует появлению штаммов микроорганизмов, резистентных к широкому спектру антимикробных препаратов.

Больным коровам назначают комплексное лечение, направленное на подавление микроорганизмов и повышение внутренних защитных сил организма. Больных животных изолируют, переводят на ручное доение. Удаляют патологический секрет, при этом для ускорения освобождения вымени от экссудата вводят подкожно или внутривенно окситоцин. В пораженные четверти вымени вводят препараты, разжижающие сгустки казеина.

В зависимости от формы и степени развития мастита применяют различные лекарственные препараты. При протекании мастита как сопутствующего заболевания назначаются средства для устранения первичной болезни. При применении этиотропных средств важно выявить вид патогенных микроорганизмов и определить чувствительность к антибиотикам. Между тем после выздоровления животного антимикробные препараты долго сохраняют способность выделяться с молоком. Молоко, получаемое от таких коров, должно быть подвергнуто термической обработке и использовано для кормления животных.

Одним из эффективных методов патогенетического лечения незаразных болезней является новокаиновая терапия, в основе которой лежит блокада различных нервных сплетений, узлов, ветвей (паралюмбальная блокада по А.Б. Башкирову, блокада промежностных нервов по И.И. Магда, паравертебральная блокада нервов вымени по И.И. Магда, блокада нервов вымени по Д.Д. Логвинову, надплевральная блокада по В.В. Мосину, аортопункции у коров по Д.Д. Логвинову и др.). Данными зарубежных и отечественных учеными доказаны спазмолитические, противовоспалительные, антигистаминные, антитоксические, бактериостатические, эстрогенные и другие свойства новокаина.

Физические методы лечения (холод, тепло, массаж, парафинотерапия, озокеритотерапия, лазерное излучение, квантовая терапия, электрофорез) назначают в зависимости от формы, стадии мастита и индивидуальных особенностей животного.

В настоящее время продолжаются исследования и разработки методов и средств, которые обладают высокой степенью эффективности лечения и исключают применение антибиотиков, что в свою очередь приводит к снижению появления устойчивых микроорганизмов и контаминации молока антимикробными агентами, которые не оказывают негативного влияния на организм животных [1, 12, 17].

**Профилактика.** В настоящее время молочное животноводство характеризуется промышленным типом разведения. В таких условиях большое значение приобретает своевременность проводимых профилактических мероприятий, которые направлены на недопущение и предотвращение заболеваний и не превращаются в негативный фактор в технологии животноводческих мероприятий.

Профилактические мероприятия должны формироваться с учетом физиологического состояния животного. Система мероприятий по предотвращению возникновения мастита должна включать следующее: отбор коров, пригодных к машинному доению; отбор коров по генетическим маркерам (полиморфные белки, В-системы групп крови); комплексный подход в подготовке нетелей к машинному доению с применением массажеров; соблюдение условий запуска коров путем снижения числа доек и уменьшения дачи концентрированных кормов; включение в рацион витаминов, микро- и макроэлементов; контроль состояния молочной железы сразу после отела, в течение лактации один раз в месяц; контроль соблюдения выполнения

технологии доения; оптимальные условия содержания (параметры микроклимата, подстилочный материал, уборка навоза), активный ежедневный мониторинг доильного оборудования; раннее исследование коров на субклинический мастит, подсчет числа соматических клеток; выбраковка коров при снижении удоев и невозможности восстановления функции молочной железы.

Оценка качества молока должна включать подсчет соматических клеток и уровень бактериальной загрязненности [10]. Один раз в три месяца проводят бактериологическое исследование секрета молочной железы, определяют чувствительность микрофлоры к различным антимикробным агентам с учетом лабораторных исследований [11].

Ветеринарные врачи должны проводить мониторинг качества и полноценности рационов, не допускать скармливания недоброкачественных кормов. Продуктивные качества коров связаны с реализацией заложенного в них генетического потенциала. Питательные вещества и энергия в потребленном животными корме оказывает наибольшее влияние на уровень продуктивности.

Мастит не теряет своей актуальности и по сей день и сохраняет тенденции к дальнейшему росту. Молочные качества коров постепенно возрастают, но условия и технологии содержания не приобретают существенных изменений. Смена и подготовка квалифицированного персонала в получении качественной молочной продукции остается важной задачей и по сей день.

Профилактика мастита у коров. Профилактику мастита у коров начинают с выявления и устранения факторов, вызывающих его возникновение, к которым в первую очередь относятся нарушения правил кормления и содержания коров. Неполнценное кормле-

ние снижает устойчивость тканей молочной железы и организма в целом к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Помимо полноценности кормов, важным является правильное соотношение в рационе грубых, сочных и концентрированных кормов, а также сахаро-протеиновое соотношение, которое способствует лучшему использованию питательных веществ и, соответственно, повышает резистентность организма.

Важное место в профилактике маститов занимает своевременный и правильно организованный запуск коров, который может быть как традиционным, продолжающимся в течение 2–3 недель, так и одномоментным. В период запуска коров исследуют на наличие субклинического мастита, больных обязательно лечат антибиотиками, к которым чувствительна микрофлора молочной железы. Не выявленный в сухостойный период субклинический мастит после отёла может перейти в клиническую форму, что приводит к атрофии доли вымени, а также заболеванию новорожденных телят.

В профилактике мастита в послеродовой период важную роль играет нормальное течение инволюционных процессов половых органов, тесно связанных с молочной железой через кровеносную и лимфатическую системы, а также через нейроэндокринные механизмы регуляции. Патологии половых органов воспалительного характера часто ведут к развитию маститов вследствие проникновения микрофлоры из первичного очага воспаления в молочную железу гематогенным или лимфогенным путем. Также увеличивается вероятность проникновения патогенных микроорганизмов в вымя через сосковый канал, поскольку выделения из половых органов обильно контактируют подстилку.

Санитарно-гигиеническое состояние помещений и животных является одним из важных факторов, от которых зависит распространение возбудителей мастита и их внедрение в организм коров. На животноводческих фермах и в помещениях необходимо постоянно поддерживать надлежащее санитарное состояние. С этой целью регулярно проводят уборку навоза и при необходимости дезинфицируют стойла. Один раз в неделю организуют санитарный день, когда проводят очистку территории фермы, помещений и оборудования. В коровниках очищают стены, окна, пол, автопоилки, места временного хранения кормов и проводят дезинфекцию.

Гигиена доения — один из основных факторов, влияющих на себестоимость и качество продукции. Она включает в себя комплекс мероприятий по поддержанию чистоты доильного оборудования и систематическое использование средств ухода за выменем. Оборудование должно обрабатываться правильно подобранными моющими средствами, при этом чередуют использование кислых и щелочных растворов. Такая методика почти полностью освобождает оборудование от наслонений грязи, молочного камня и жира. При двухразовом доении утром моют молокопроводящие системы доильной установки щелочным моющим раствором, а вечером — кислым.

Получение молока высокого качества с уровнем соматических клеток до 250–280 тыс./мл и бактериальным обсеменением до 50 тыс. КОЕ/мл требует дисциплины и профессионализма дояров. Профилактика мастита в значительной степени зависит от соблюдения технологии и индивидуальной гигиены. Оператор машинного доения должен следить за чистотой рабочей одежды и обуви, перед доением тщательно мыть руки теплой водой с мылом и дезинфи-

цирующими средствами. Перед началом доения доярка обязана осмотреть соски и вымя, а при обнаружении каких-либо отклонений сообщить ветеринарному врачу.

Перед доением вымя подмывают, проводят подготовительный массаж и сдаивают первые порции молока, после чего соски вытирают насухо одноразовыми или индивидуальными полотенцами. В некоторых хозяйствах для обработки вымени перед доением проводят погружение сосков в 1%-ный раствор перекиси водорода.

Непосредственно перед доением проводят более энергичный массаж, вначале массируют каждую половину молочной железы, а затем каждую четверть отдельно. Все процедуры должны быть выполнены в течение 40–60 секунд, после чего необходимо надеть на соски стаканы, так как у коровы начинается естественный припуск молока. Первые порции молока сдаивают в сосуд с сеточкой на темном фоне, что позволяет увидеть хлопья, наличие которых указывает на заболевание молочной железы. Выдаивать первые порции молока на пол доильного зала недопустимо, так как приводит к распространению возбудителей мастита. Сдаивание первых порций молока имеет физиологическое, санитарное и диагностическое значение.

Одной только подготовки вымени перед доением для полной защиты молочной железы недостаточно, нужно обработать ее и после окончания доения. После доения вымя вытирают одноразовым или индивидуальным полотенцем и обрабатывают одним из дезинфицирующих растворов. Уместным является использование специальных кремов и эмульсий, они относятся к группе недорогих средств ухода за выменем. Хороший эффект дает использование специальных пленкообразующих средств, которые после нанесения на сосок стано-

вятся густыми и защищают его до следующего доения не только от воздействия микроорганизмов, но и от пересыхания и последующего образования трещин.

Таким образом, основными мероприятиями по профилактике и контролю маститов следует считать: контроль за работой молочного оборудования; соблюдение правил гигиены при доении; выявление субклинических маститов; регулярные клинические осмотры коров, их изоляция и доение в последнюю очередь; лечение животных с клинически выраженным и субклиническими маститами; выбраковку коров с агалактией, предрасположенных к возвратным маститам, плохо поддающихся лечению или имеющих высокое содержание соматических клеток в молоке; клинический осмотр и пальпация вымени всех вновь поступающих животных с исследованием на субклинические формы болезни с использованием маститных тестов; контроль сосков на наличие повреждений, папиллом и других поражений, которые могут служить предрасполагающими факторами в этиологии мастита; полное выдаивание коров, сбор молока от больных в отдельную тару; мойку и дезинфекцию животноводческих помещений, доильного оборудования и инвентаря, соблюдение ветеринарно-санитарных правил и требований.

**Специфическая профилактика.** Вакцинация является одним из современных методов борьбы с маститами, при этом отмечается не только профилактический, но и лечебный эффект. Имунизация, по утверждению производителей, не обеспечивает полного исчезновения маститов, но существенно снижает их количество, облегчает тяжесть и длительность течения, позволяет сократить применение антибиотиков при лечении животных. Также очень важным эффектом иммунизации является повышение сортности про-

изводимого молока, поскольку у вакцинированного поголовья количество соматических клеток в молоке не превышает 150–200 тыс. в 1 мл, тогда как в контрольных группах животных, содержащихся в аналогичных условиях, их количество бывает в 2–4 раза выше.

Добиться эффективности от иммунизации дойного стада можно лишь при соблюдении определенных условий, среди которых основным можно считать проведение мониторинга распространения определенных возбудителей маститов в стаде. Поскольку спектр микроорганизмов, вызывающих маститы, достаточно широк, эффективность проведенной иммунизации может быть лишь в том случае, если в препарате содержатся антигены циркулирующего в хозяйстве микроорганизма.

Для достижения ожидаемого эффекта иммунизацию начинают с телок, а в последующем ревакцинируют нетелей и коров при каждой последующей стельности. Дополнительно проводят иммунизацию дойного стада каждые шесть месяцев. Постvakцинальный иммунитет составляет около 6 месяцев.

Как и большинство инактивированных ассоциированных препаратов, вакцины против маститов вводят двукратно с интервалом 20–28 дней, что позволяет индуцировать у коровы напряженный иммунитет ко всем входящим в состав микроорганизмам через 14 дней после повторного введения. Есть мнение, что вакцинация обостряет течение субклинических маститов, переводя их в клиническую форму, что позволяет быстрее выявить и своевременно начать лечение.

Дополнительным положительным аспектом применения препаратов против маститов является профилактика эндометритов, заболеваний конечностей у коров и желудочно-кишечных болезней у телят.

Однако из-за многообразия патогенов, вызывающих маститы, вакцины пока не могут стать панацеей, тем более их не очень много. В настоящее время в РФ зарегистрирован и применяется лишь один зарубежный препарат, предназначенный для защиты животных от маститов, вызываемых золотистым стафилококком (*S. aureus*) и *Escherichia coli*. Несомненно, эти две бактерии часто становятся причиной инфекционных маститов, но нельзя отрицать и роли других возбудителей, особенно стрептококков, трупереллы и некоторых других возбудителей. Однако их отсутствие в составе делает препарат ограниченным в применении.

## Литература

1. Абаймова А.Д. Резистентность организма коров и эффективность их лечения при мастите в лактационный период. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. М., 1999; 24.
2. Абдрахманов Т.Д. Разработка способов диагностики, терапии, профилактики послеродового гнойно-катарального эндометрита и субклинического мастита у коров. Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. Саратов, 2002; 48.
3. Абрязанова Ю.А., Барановский И.С., Орлова Т.А. Профилактика мастита у коров. Конф. Теоретические и практические аспекты формирования и развития «Новой науки». 2020; 162–165.
4. Амерханов Х.А., Самуиленко А.Я., Шабунин С.В., Гулюкин М.И. и др. Методические рекомендации по адаптации импортного высокопродуктивного молочного скота в Российской Федерации. ФГБНУ «Росинформагротех», 2018; ISBN978-5-7367-1467-4.
5. Дробин Ю.Д., Зубенко А.А. и др. Способ лечения маститов у животных. Патент на изобретение 2019127355, 29.08.2019.
6. Искандарова С.С., Бондаренко В.З., Федоров А.И., Искандаров М.И., Горбатов А.В., Юмашева М.А., Альберян М.П., Гулюкин М.И. Средство для профилактики мастита у крупного рогатого скота. Патент на изобретение № 2605631. 01.12.2016 г.
7. Капустин А.В., Лайшевцев А.И. Специфическая профилактика маститов крупного рогатого скота. Актуальные ветеринарные аспекты молочного и мясного животноводства. Межд. вет. конгресс.
8. Козлов А.Н. и др. Машинаное донение и аспекты профилактики заболеваний коров маститом. АПК России. 2020; 27(2): 327–332.
9. Колчина А.Ф., Баркова А.С., Барашкин М.И. Современные методы в диагностике патологии молочной железы высокопродуктивных коров. Аграрный вестник Урала. 2012; 12: 12–14.
10. Колчина А.Ф. Болезни молочной железы высокопродуктивных коров. БИО. 2008; 2: 8–10.
11. Краевский А.И., Рубленко М.В., Дюльгер Г.П. и др. Бактериальный мастит у коров. Сумы: Сумський національний аграрний університет, 2014; 215.
12. Ларионов Г.А., Вязова Л.М. Царевский И.В. Профилактика и лечение субклинического мастита коров. Монография. Чебоксары: Новое время, 2016; 132.
13. Лиценцова М.Н. Фармакология и применение гуанидинового производного роксацина. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Краснодар, 2013; 5–16.
14. Малыгина Н.А., Медведева Л.В. Патология молочной железы, лечение маститов и хирургических болезней вымени: учебное пособие для студентов факультета ветеринарной медицины. Барнаул РИО Алтайского ГАУ. 2016; 14–20.

15. Манжурина О. А. и др. Микрофлора молока клинически здоровых и больных маститом коров. Ветеринария. 2020; 3: 38–40.
16. Нежданов А.Г., Слободняк В.И., Ходаков А.В. Морфо-физиологические основы лактации и болезни молочной железы сельскохозяйственных животных. Учебное пособие. Воронеж: ВГАУ, 1997; 66.
17. Решетка М.Б. Профилактика и лечение мастита без применения химиотерапевтических средств. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Краснодар, 2013; 12–16.
18. Родионов Г.В., Остроухова В.И., Табакова Л.П. Маститы коров: Учебное пособие. РГАУ МСХА. М., 2015; 72.
19. Шевченко А.А., Черных О.Ю., Кощаев А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. и др. Диагностика, профилактика и лечение факторных бактериальных инфекционных болезней животных: Методические рекомендации. Краснодар. 2019; DOI:10.21515/19-2-06.02-005.
20. Arcangioli M.A., Chazel M., Sellal E., Botrel M.A., Bezille P., Poumarat F., Calavas D. and Le Grand D. Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: preliminary field investigation in southeast France. NZ. Vet. J. 2011; 59: 75–78.
21. Argudin M.A., Mendoza M.C. and Rodicio M. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins. 2010; 2(7): 1751–1773.
22. Blackwell J.H., McKercher P.D., Kosikowski F.V., Carmichael L.E. and Gorewit R.C. Histological and histochemical characterization of mammary gland tissue of cows infected with foot-and-mouth disease by contact exposure. Res. Vet. Sci. 1983; 35: 106–113.
23. Filoussis G., Christodoulopoulos G., Thatcher A., Petridou V., Bourtsi-Chatzopoulou E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. Vet. J. 2007; 173: 215–218.
24. Khan I.U., Hassan A.A., Abdul-mawjood A., Lanimler C., Wolter W. and Zschock M. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional methods. J. Vet. Sci. 2003; 4: 213–223.
25. Nevala M., Taponen S. and Pyorala S. Bacterial etiology of clinical mastitis — data from Saari Ambulatory Clinic in 2003–2004. Finnish Vet. J. 2004.
26. Peeler E.J., Green M.J., Fitzpatrick J.L. and Green L.E. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. Prev. Vet. Med. 2003; 59: 169–180.
27. Popescu M.S. Doctoral thesis on “Etiological research of mastitis in cows”, Unisiversity of agricultural sciences and veterinary medicine of Banat Timiooara. 2010.
28. Sharma N., Rho G.J., Hong Y.H., Kang T.Y., Lee H.K., Hur T.Y. and Jeong D.K. Bovine mastitis: an asian perspective. Asian J. Anim. Vet. Adv. 2012; 7: 454–476.
29. Sharma N. and Vohra V. An update on bovine mastitis in India. Proceedings of the 11<sup>th</sup> Indian Veterinary Congreas and XVIII annual conference of AAVR. Jaipur. Rajasthan. India. 2011; 20–24.
30. Srivastava A.K., Kumaresan A., Manimaran A. Mastitis in dairy animals: An update. Express Tower. India. 2015; 403.
31. Sudhan N.A. and Sharma N. Mastitis: An important production disease of dairy animals. 1<sup>st</sup> Edn. Sarva manav Vikas Samiti Publishers. Gurdaon. India. 2010; 72–88.
32. Wellenberg G.J., Van der Poelb, W.H.M. and Van Oirschot J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. Vet. Microbiol. 2002; 88: 27–45.
33. Karmali M.A. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. Mol. Biotechnol. 2004; 26(2): 117–122.
34. Schuchat A. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. Clin. Infect. Dis. 2001; 33(6): 751–756.

# **IX. МИКОТИЧЕСКИЕ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

*Маноян М.Г., Панин А.Н.*

**Введение.** Микозы животных — инфекционные заболевания, вызываемые болезнетворными грибами, — остаются относительно малоизученной областью ветеринарной медицины. Они труднодиагностируемы, требуют специфического подхода к терапии и профилактике.

В последние десятилетия во всем мире отмечается рост заболеваемости микозами как среди людей, так и среди животных. В современных условиях организм животных испытывает постоянное давление целого ряда неблагоприятных внешних факторов, обуславливающих снижение естественной резистентности. Возросло количество пород животных с врожденной дисфункцией иммунной системы; широкое распространение получили экзотические породы и даже виды животных, нетипичные для нашей климатогеографической зоны. Из-за интенсификации международных связей, а также из-за климатических изменений существенно расширился ареал многих патогенных и потенциально патогенных грибов, в т.ч. эндемичных видов. Все эти факторы способствуют росту заболеваемости микозами среди животных.

Микозы животных имеют существенное эпидемиологическое значение, т.к. многие из них являются общими для человека и животных, в силу чего больные животные могут представлять существенный риск для здоровья человека. Вследствие этого микозы приобретают статус социально значимой проблемы, в решении которой первостепенную роль играет своевременная и квалифицированная диагностика.

Существенно расширены представления об этиологии и патогенезе ми-

ков, получили распространение новые, ранее не известные заболевания, обострилась проблема бессимптомного миконосительства у животных.

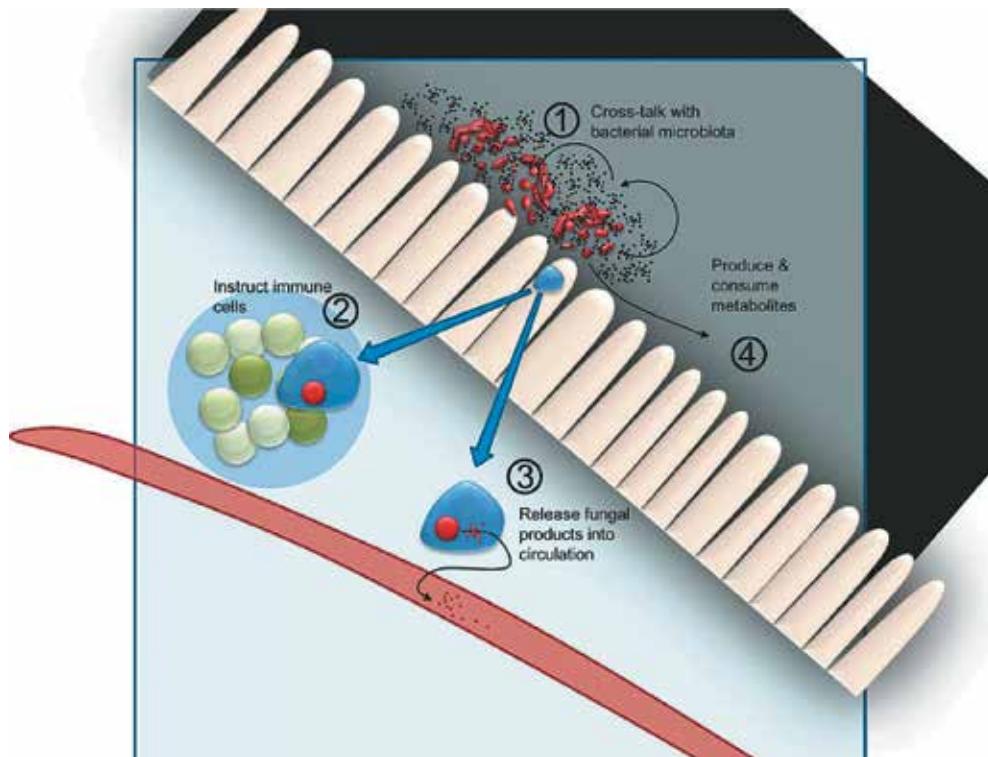
Материалы раздела основаны на собственном опыте авторов — сотрудников отдела ветеринарной микологии ФГБУ «ВГНКИ», а также на работах видных отечественных и зарубежных медицинских и ветеринарных микологов, публикациях современной научной периодики.

**Микобиом и его значение в жизни млекопитающих.** Грибы все чаще признаются в качестве общих представителей микробиома живого организма. Возрастает интерес к изучению их разнообразия, взаимодействия с иммунной системой живого макроорганизма, их влияния на уровень заболеваемости.

Микобиом оказывает большое влияние на состав бактериома и поддерживает структуру и функцию микробных сообществ. Грибы положительно влияют на иммунные реакции хозяина, но могут вызывать различные заболевания (возбудители оппортунистических микозов) (*рис. 1*).

Изменение количественного и видового состава микобиома происходит под действием различных внешних факторов, например в результате воздействия лекарственных веществ. Вместе с тем выявлена способность грибковых сообществ адаптироваться к изменениям условий внешней среды.

В последние годы при использовании метода высокопроизводительного секвенирования были проанализированы структура и состав микобиома в полости рта, легких, кишечнике, влага-



**Рис. 1. Изменения количества комменсальных грибов могут по-разному влиять на организм хозяина:** 1 — изменение количества кишечных грибов при применении пробиотических или противогрибковых препаратов может изменить состав бактериальной микробиоты;

2 — грибы, обнаруживаемые кишечной иммунной системой, могут привести к воспалительным или толерантным иммунным реакциям и управлять переносом иммунных клеток; 3 — фагоциты, переваривающие грибы, могут высвобождать молекулы грибкового происхождения, которые попадают в кровоток, оказывают иммунорегуляторное действие; 4 — кишечные грибы высвобождают и потребляют метаболиты, которые приводят к активации или к подавлению иммунных реакций

лице и коже, а также роль микробиома в различной патологии. Проведенные исследования позволили выявить более высокое разнообразие грибов, чем это было установлено ранее с помощью культуральных методов. В настоящее время наиболее полно исследованы микробиомы полости рта, ЖКТ и кожи.

**Микробиота в полости рта.** Полость рта является одним из первых участков слизистой оболочки, где было описано бессимптомное носительство грибов. Установлено довольно низкое разнообразие в микробиоте полости рта, где

преобладают представители *Ascomycota*, главным образом *Candida spp.* Генетические методы выявили в полости рта присутствие нескольких представителей семейства *Saccharomycetaceae* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. pararugosa*, *S. cerevisiae*, *H. uvarum* и *Pichia spp.*) и рода *Fusarium spp.* Интересным является факт, что у здоровых особей, у которых наблюдали *Pichia*, отсутствовали известные грибковые патогены рода *Cryptococcus*, *Fusarium* и *Aspergillus*. При этом достоверно было установлено, что питательная среда, об-

работанная *Pichia*, способна ингибировать рост *Candida*, *Aspergillus* и *Fusarium*. Ингибирующее действие *Pichia* — кондиционированной среды было связано с секретируемым пептидом, возможно, микотоксином, подавляющим рост и развитие *Candida*, *Aspergillus* и *Fusarium*.

**Микобиота в желудочно-кишечном тракте.** Грибковое сообщество в нижнем отделе ЖКТ более богато и разнообразно, чем в верхнем отделе ЖКТ. Однако проведенный анализ 36 опубликованных статей о кишечной микробиоте показал, что только 15 из 267 идентифицированных видов были обнаружены более чем в пяти исследованиях. Среди этих 15 видов 13 могут расти при 37°C и, следовательно, могут постоянно обитать в кишечной нише. Данные виды относятся к родам *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Cladosporium*, *Galactomyces* и *Trichosporon*. Вместе с тем, несмотря на большое количество проведенных исследований, в настоящее время остается много вопросов без ответа о тех грибах, чья ниша — нижний отдел ЖКТ: что они делают у здорового хозяина и будет ли их отсутствие вредным? Являются ли виды взаимозаменяемыми, т.е. есть ли какой-либо эффект в замене *C. albicans* на *C. tropicalis* или *C. parapsilosis* у отдельного хозяина? Конкурируют ли виды или штаммы одного и того же вида? Если да, то есть ли предсказуемые результаты?

**Микобиота кожи.** Проведенные генетические исследования микробиоты кожи обнаружили удивительные различия, в том числе в микологическом разнообразии между разными топографическими участками кожи. В общем на коже преобладают грибы рода *Malassezia*, но обнаружены и грибы родов *Rhodotorula*, *Debaromyces*, *Cryptococcus* и *Candida*. Хотя, как уже упоминалось выше, микробиом кожи вообще и микробиом в частности находятся в тесной

зависимости от условий внешней среды. При этом грибы рода *Malassezia* хотя и являются частью микробиоты здоровой кожи, они также связаны с рядом кожных заболеваний и наружных отитов.

Объективная диагностика микозов возможна только при проведении полного и квалифицированного лабораторного микологического исследования. Однако ветеринарные лаборатории общего профиля не всегда обладают должным материально-техническим оснащением, необходимым для микологических исследований. Остро ощущается нехватка квалифицированных кадров в области ветеринарной микологии.

**Классификация и номенклатура микозов животных.** Грибы представляют самостоятельное царство (*Fungi*), в котором по современной классификации насчитывается четыре отдела: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*. Практически в каждом из них известны виды, патогенные для животных. Отделы подразделяются на классы, порядки, семейства, роды и виды.

Номенклатура микозов основана на видовом названии возбудителя с прибавлением суффиксов «-аз», «-иаз», «-оз», «-микоз». Однако, по мнению экспертов Международного общества микологии человека и животных (ISHAM), она довольно нестабильна, может изменяться в зависимости от получения новых клинико-эпизоотологических и таксономических данных.

Микозы классифицируют исходя из таких критериев, как локализация патологического процесса, диапазон паразитарной активности возбудителя, степень контагиозности заболевания. Исходя из локализации патологического процесса, традиционно выделяют четыре категории микозов:

1) поверхностная колонизация (без проникновения в ткани);

- 2) поверхностная инфекция кожи и (или) слизистых оболочек;
- 3) подкожная инфекция;
- 4) глубокая инфекция (которая может быть локализованной или диссеминированной).

Следует отметить, что в некоторых случаях возбудители поверхностных микозов могут проникать в глубокие ткани и внутренние органы, а возбудители глубоких микозов — ограничиваться лишь поражением кожи. Существует классификация, где все микозы разделяют на поверхностные, оппортунистические и глубокие (висцеральные).

Многие микозы являются зоонозами, т.е. болезнями, общими для человека и животных.

Контагиозность различных микозов существенно варьирует. Высокоcontra-

гиозными являются возбудители кокцидиоидоза, гистоплазмоза, бластомикозов и отдельных дерматофитозов. Передача возбудителей микозов может осуществляться контактным, аэрогенным, алиментарным путем. Некоторые потенциально патогенные виды являются постоянными обитателями организма животного (грибы родов *Candida*, *Malassezia*). При многих микозах определяющим фактором возникновения заболевания является состояние резистентности макроорганизма.

Резервуаром патогенных грибов служат как больные животные, так и различные объекты внешней среды: почва, вода, растительные материалы. Многим патогенным видам грибов присущ диморфизм, т.е. они существуют во внешней среде в сапротроф-

**Таблица 1. Основные возбудители поверхностных, висцеральных и оппортунистических микозов**

Возбудители микозов	Название гриба	Название болезни
Возбудители поверхностных микозов кожи и ее производных	Грибы, относящиеся к роду <i>Trichophyton</i> : <i>T. verrucosum</i> , <i>T. equinum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. erinacei</i> , <i>T. benhamiae</i>	трихофития
	Грибы из рода <i>Microsporum</i> : <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. nanum</i> , <i>M. gallinae</i>	микроспория
Возбудители глубоких микозов кожи и ее производных	<i>Sporotrichum schenckii</i> , <i>S. globosa</i> , <i>S. mexicana</i> , <i>S. luriei</i> и <i>S. brasiliensis</i>	споротрихоз
	<i>Cryptococcus farciminosus</i>	эпизоотический лимфангоит
Возбудители системных микозов	<i>Histoplasma capsulatum</i>	гистоплазмоз
	<i>Coccidioides immitis</i>	кокцидиоидомикоз
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	криптококкоз
	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	бластомикоз
Возбудители оппортунистических микозов	<i>Mucor pusillus</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	мукормикоз
	Род <i>Penicillium</i> : <i>P. crustaceum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. glaucum</i> , <i>P. mycetogenum</i> , <i>P. citrinum</i>	пенициллез
	Род <i>Aspergillus</i> : <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i>	аспергиллез
	Грибы из рода <i>Candida</i> : <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i>	кандидомикоз
Возбудители микотоксикозов	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>	аспергиллотоксикозы
	Грибы рода <i>Fusarium</i> : <i>F. sporotrichiella</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. niveale</i>	фузариотоксикозы
	<i>Stachybotrys alternans</i>	стахиботриотоксикоз

ной (мицеллиальной) форме, которая по морфологическим и физиологическим свойствам может существенно отличаться от паразитарной (тканевой, дрожжеподобной) формы. Вместе с тем некоторые возбудители являются obligатными паразитами, не способными существовать вне организма-хозяина. Грибы, занимающие преимущественно сапротрофную нишу, но способные инфицировать макроорганизм в условиях снижения резистентности, как правило, рассматриваются как оппортунистические патогены.

**Принципы лабораторной диагностики микозов животных.** Лабораторная диагностика микозов животных состоит из следующих основных этапов: выявление гриба-возбудителя в пораженных тканях; выделение культуры возбудителя; его видовая идентификация; определение возможных методов терапии заболевания.

*Первый этап исследования* — сбор анамнеза, описание клинической картины заболевания, отбор патологического материала.

Поступивший на исследование образец патматериала подвергается *прямому микроскопическому исследованию*. В зависимости от характера патматериала он может быть исследован непосредственно или после приготовления препарата соответствующими методами. Перед культуральным исследованием может возникнуть необходимость в предварительной обработке образца (разведение, приготовление суспензии, центрифugирование). В ряде случаев патматериал высевают без предварительной обработки.

Для выделения гриба из патматериала проводят посевы на микологические питательные среды — неселективные, селективные, хромогенные и т. д.

Следующий этап — *идентификация полученной чистой культуры*. Культу-

ру гриба микроскопируют, изучают ее морфологические признаки, на основании которых может быть определена родовая и видовая принадлежность. При необходимости культуру пересевают на соответствующую диагностическую среду. Если и на диагностической среде идентифицировать гриб не удается, то прибегают к физиологическим исследованиям (ферментация, ассимиляция, потребность в факторах роста, температурная зависимость и другие специфические тесты).

При выделении гриба, не являющегося «истинным патогеном» (грибы-оппортунисты), проводят интерпретацию его клинической роли. На заключительном этапе лабораторного исследования проводят определение чувствительности возбудителя к антифунгальным препаратам.

**Дерматофитозы.** Дерматофитозы составляют наиболее обширную группу среди всех поверхностных микозов. Им подвержены практически все домашние, сельскохозяйственные животные, пушные звери, птицы. Большинство диких животных также болеют дерматофитозами. Восприимчив и человек.

Возбудителями дерматофитозов являются грибы из группы дерматофитов, которых объединяет способность проникать в кератинизированные ткани (кожу и ее производные), т.е. обладают выраженной кератинофильностью. Они относятся к трем родственным родам — *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*, однако представители последнего рода могут вызывать инфекции только у человека (за редким исключением). В зависимости от возбудителя дерматофитозы подразделяют на трихофитию, вызываемую грибами рода *Trichophyton*, и микроспорию, вызываемую грибами рода *Microsporum*.

Таблица 2. Основные виды дерматофитозов и восприимчивые к ним животные

Род возбудителя	Виды возбудителя	Восприимчивые животные
<i>Trichophyton</i>	<i>T. verrucosum</i>	крупный рогатый скот, овцы, козы, зебу, буйволы, верблюды, олени, реже — лошади, обезьяны, пушные звери, собаки
	<i>T. mentagrophytes</i>	морские свинки, мышевидные грызуны, кролики, пушные звери, нутрии, реже — КРС, лошади, свиньи, собаки
	<i>T. equinum</i>	лошади, реже — собаки
	<i>T. verrucosum var. autotrophicum</i>	мелкий рогатый скот
	<i>T. benhamiae</i>	морские свинки
	<i>T. erinacei</i>	ежи
	<i>T. simii</i>	обезьяны, птицы
<i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i>	собаки, кошки, пушные звери, морские свинки, обезьяны, лошади, свиньи, мыши, крысы, тигры, обезьяны
	<i>M. gypseum</i>	собаки, мыши, крысы, реже — лошади
	<i>M. nanum</i>	верблюды, морские свинки, кошки
	<i>T. simii</i>	обезьяны, птицы

**Экология дерматофитов.** Традиционно дерматофиты подразделяют на несколько групп в зависимости от условий естественного обитания. Геофильные виды дерматофитов обитают в почве, как правило, богатой кератинсодержащим субстратом, и способны инфицировать человека и животных (прежде всего грызунов). Таким образом, почва является основным резервуаром для геофильных грибов и поддерживает патогенные свойства длительное время. К геофильным видам относятся *M. cookei*, *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. nanum*, *M. praecox*, *M. vanbreuseghemii*.

Зоофильные виды дерматофитов, как правило, паразитируют на животных, но многие из них способны инфицировать и человека. Среди зоофильных дерматофитов существует определенная избирательность в отношении животного-хозяина, однако она не является абсолютной. Деление дерматофитов по экологическим нишам довольно условно, и разные авторы могут относить один и тот же вид гриба к разным категориям. Один и тот же вид дерматофита может поражать различные виды животных, а также человека.



Рис. 2. Микроспория предплечья хозяина, контактирующего с больной микроспорией кошкой (поражение локализовано на носу)



Рис. 3. Типичное поражение микроспорией у собаки на спине и микроспорийный очаг на ноге у хозяина

**Клинические особенности.** Дерматофиты способны инфицировать только поверхностные кератинизированные ткани. В редких случаях гриб способен проникнуть в более глубокие слои. Тем не менее известны отдельные случаи висцеральных микозов, вызываемых дерматофитами. В пораженных тканях дерматофиты присутствуют в виде мицелиальных гиф и артроспор. Для разных видов дерматофитов характерны различные способы инфицирования волос. Одни виды образуют споры вокруг стержня волоса (тип эктотрикс (*ectothrix*)) — *M. canis*, *M. gallinae*, *M. gypseum*, *M. napum*, *T. verrucosum*. Другие виды производят споры внутри волоса (тип эндотрикс (*endothrix*)) — *T. tonsurans*. Эти признаки могут служить только для ориентировочной оценки видовой принадлежности гриба.

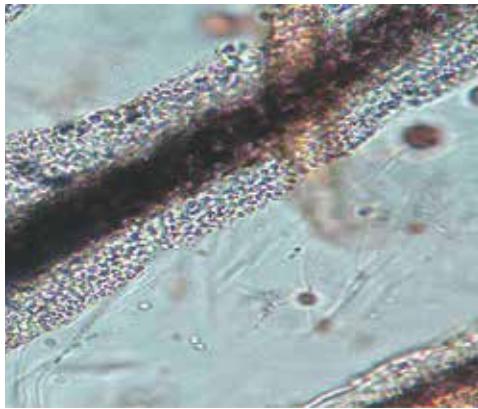


Рис. 4. Волос, пораженный артроспорами дерматофита по типу эктотрикс

Клинические проявления дерматофитоза могут варьировать от незначительного шелушения эпидермиса до интенсивных поражений, затрагивающих глубокие слои кожи и подкожной клетчатки. При локализованной форме образуются округлые алопеции, покрытые корочками и чешуйками; при диссеминированной форме отдельные поражения сливаются и распространяются на значительную площадь поверхности тела. При везикулярной форме наблюдают образование мелких, быстро подсыхающих пузырьков, которые обычно локализуются на внутренней поверхности бедер. При инфильтративно-нагноительной форме поражения покрыты серозно-гнойными корками, характеризуются ярко выраженной экссудацией и воспалением. Чаще всего поражения локализуются в области головы, на морде, на конечностях, однако может поражаться любая часть тела.

### Трихофития крупного рогатого скота

**Историческая справка.** Трихофития как дерматофитоз известна с древних времен. Еще арабские ученые XII в. описывают сходные заболевания у людей. В 1820 г. военный ветеринарный врач Эрнст в Швейцарии сообщил о заболевании стригущим лишаем девушки, заразившейся от коровы.

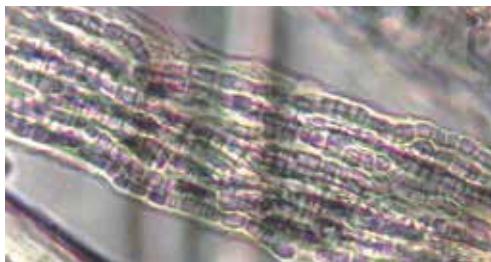
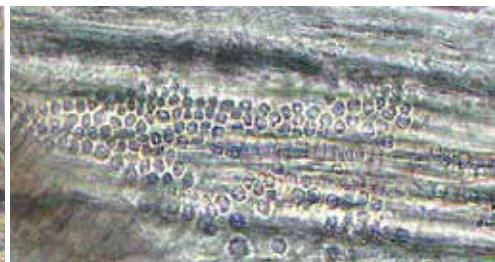


Рис. 5–6. Волос, пораженный артроспорами дерматофита по типу эндотрикс



Научное изучение болезней началось со времени открытия возбудителей трихофитии (Мальмстен, 1845) в Швеции, парши (Шенлейн, 1839) в Германии, микроспории (Груби, 1841) во Франции. Французский исследователь Сабуро впервые предложил классификацию возбудителей грибных болезней кожи. Отечественные ученые внесли большой вклад в изучение дерматофитозов, в частности в разработку средств специфической профилактики (А.Х. Саркисов, С.В. Петрович, Л.И. Никифоров, Л.М. Яблочник и др.), получивших мировое признание.

**Трихофития** — инфекционная болезнь, характеризующаяся появлением на коже резко ограниченных, шелушащихся участков с обломанными у основания волосами или развитием выраженного воспаления кожи, с выделением серозно-гнойного экссудата и образованием толстых асбестовидных корок.

Основным возбудителем трихофитии у КРС является *T. verrucosum*.

Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные, от которых при непосредственном контакте заражаются здоровые. Для домашних и сельскохозяйственных животных источником могут быть больные трихофитией мыши, крысы, полевки. Факторами передачи болезни являются все элементы внешней среды, контактированные грибами данного вида: почва, корма, предметы ухода за животными, пастбища, коровники и телятники, где содержали больных животных.

Наиболее активно заболевание проявляет себя в осенний, зимний и весенний период. Распространению возбудителя способствуют нарушения санитарно-гигиенических условий содержания и эксплуатации животных, появление на коже ссадин, царапин, ран, потертостей, мацерированных участков, скученность животных, неполноценное кормление.

**Клинические признаки трихофитии крупного рогатого скота.** К заболеванию более восприимчивы телята, особенно молодняк от 1,5 месяцев до 1 года. Болезнь сопровождается появлением на коже очерченных очагов, которые локализуются у молодняка главным образом вокруг глаз, носа, хвоста, на ушах, шее, спине; у взрослых животных — на крупье, ягодицах, спине, груди; у отдельных животных могут поражаться нижние конечности.

Поверхностная форма заболевания начинается с образования на коже плотных бугорков (узелков), которые легко прощупать при пальпации кожи. В дальнейшем бугорки размягчаются, появляются возвышающиеся резко очерченные круглые пятна. В начальной стадии процесса пятна покрыты чешуйками, волосы в этих местах взъерошенные, имеют матовый цвет, обламываются у самого устья фолликулов. В дальнейшем пятна начинают покрываться корочками серо-белого цвета, которые при отпадании обнажают безволосые участки. В течение 1–3 месяцев пятна могут увеличиваться или сливаться, достигая размеров ладони, при этом поверхность их покрывается асбестовидными корками. Кожа в этих местах при отсутствии волосяного покрова начинает усиленно шелушиться, иногда становится складчатой. Заживление очагов поражения начинается с центра. Часто в первой стадии болезни и при заживлении у животных наблюдается зуд.

Глубокая, или фолликулярная, форма трихофитоза сопровождается резко выраженным в местах поражения воспалительными процессами, сопровождающимися экссудативными явлениями. Очаги поражения при данной форме глубоко инфильтрированы и покрыты корками. В дальнейшем происходит развитие гнойного фолликулита и образование абсцессов в периболликулярной

ткани. При визуальном осмотре у животного отмечаются припухлости, которые возвышаются на поверхности кожи. При надавливании на пораженный участок из него выделяется гной, волосы при этом легко выдергиваются из фолликулов.



Рис. 7–9. Многочисленные асбестовидные корки на морде, шее и крупе теленка



Рис. 10. Обширное поражение тела годовалого теленка возбудителем трихофитии *Trichophyton verrucosum*

Стертая, или атипическая, форма трихофитии обычно наблюдается в летний период. Данная форма сопровождается появлением на голове и других участках животного очагов облысения округлой формы, при отсутствии признаков воспаления кожи.

Несмотря на то что *T. verrucosum* вызывает в большинстве случаев (более 90%) заражение крупного рогатого скота трихофитией во всем мире, однако и другие дерматофиты, такие как *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* и *M. canis* также были зарегистрированы у крупного рогатого скота. Инфицирование животных зоофильным видом гриба *T. mentagrophytes* обусловлено частыми контактами их с крысами и домашними животными, такими как собаки и кошки.

**Диагностика, морфологические и культуральные особенности дерматофитоза крупного рогатого скота.** Опытному ветеринару при осмотре больного животного достаточно легко поставить диагноз «дерматофитоз» у крупного рогатого скота. Но бывают случаи, когда необходимо провести лабораторные исследования для подтверждения наличия возбудителя.

Для микроскопического исследования необходимо взять патологический материал от больного животного в виде струпьев, корочек, чешуек, небольшое количество волос не срезая, а выдергивая,

в основном по краю поражения, так как возбудитель размножается в волосяном фолликуле.

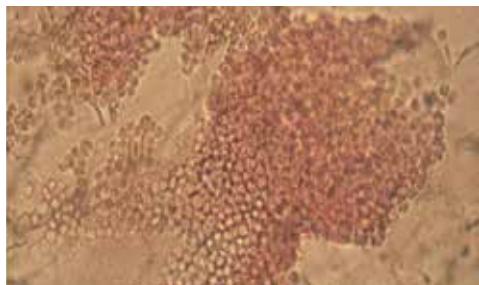
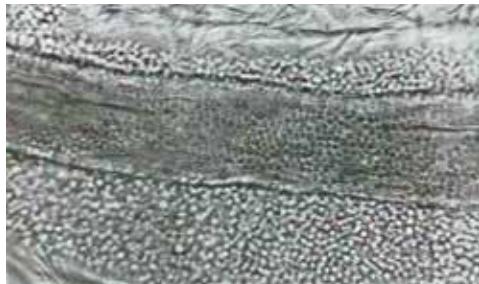


Рис. 11–12. Слева: микроскопия пораженного трихофитией волоса крупного рогатого скота. Мицелий возбудителя *Trichophyton verrucosum*, распавшийся на артроспоры, которые расположены как внутри, так и снаружи волоса (6–8 мкм). Справа: многочисленное скопление артроспор в чешуйке

На питательных средах (сусло-агар, агар Сабуро и др.) при температуре 25–28°C возбудитель на 6–30-е сутки образует врастаяющие в субстрат плоские, складчатые, кожистые колонии белого, серого, кремового или темно-желтого цвета.



Рис. 13. Мозговидная складчатая колония культуры *T. verrucosum*, выращенная на среде сусло-агар



Рис. 14. Белая пушистая колония с приподнятым центром, 21-дневная культура *T. verrucosum* на среде Сабуро

**Терапия и профилактика дерматофитоза крупного рогатого скота.** Существует несколько вариантов терапии дерматофитоза. Выбор зависит от конкретной формы проявления болезни. Первое, что необходимо сделать — по возможности изолировать больное животное от общего стада для предотвращения дальнейшего распространения болезни.

В хозяйстве, неблагополучном по трихофитии, всех животных подвергают клиническому осмотру каждые 10 дней, больных и подозрительных изолируют и иммунизируют терапевтической дозой противогрибковой вакцины. После каждого случая выделения больных животных место его нахождения дезинфицируют.

В начальной стадии болезни и при малой площади поражения используют различные противогрибковые мази, в частности мазь Ям, Фунгин, Зоомиколь и др. В комплексе с противогрибковыми препаратами можно применять и кератолитические составы, такие как 10% раствор йода, 20% раствор медного купороса, серная мазь, разбавленная салициловая кислота и 20% дегтярная мазь, что позволит ускорить естественные процессы заживания кожи.

Терапия трихофитии крупного рогатого скота является крайне длительной процедурой, которая требует определенных затрат средств и времени. Существует достаточно высокая вероятность того, что в процессе лечения патогенные микроорганизмы попадут на кожу человека и спровоцируют возникновение у него дерматофитоза. Поэтому значительно эффективнее осуществить ряд профилактических и терапевтических мер, которые предупредят возникновение болезни и все сопутствующие ей неудобства. Наиболее эффективным методом такой профилактики и терапии является применение вакцины против дерматофитоза, в частности трихофитии крупного рогатого. С этой целью используются зарегистрированные на территории в РФ иммунобиологические средства: ЛТФ-130, ЛТФ-201, Вермет, Вакдерм-ТФ, обладающие как профилактическим, так и терапевтическим эффектом. Вакцины применяются согласно инструкции по применению.

Ежедневно в помещениях, где находятся больные животные, проводят механическую очистку, навоз и остатки корма подвергают обеззараживанию на территории навозохранилища.

После механической очистки животноводческих помещений и выгулов для животных проводят текущую дезинфекцию каждые 10 дней, используя растворы фунгицидной концентрации: 4%-ный раствор гидроокиси натрия; щелочной раствор формальдегида, содержащий 2% формальдегида и 1% гидроокиси натрия; 4%-ный раствор парасода или фоспара. Норма расхода дезраствора в типовых помещениях — 1 л/м<sup>2</sup> при экспозиции три часа. При дезинфекции почвы расход раствора — 5–10 л/м<sup>2</sup>. После дезинфекции помещения моют горячей водой и высушивают, по необходимости осуществляют дератизацию и дезинсекцию.

Осуществляя заключительную дезинфекцию, рекомендуется использовать щелочной раствор формальдегида, а после трехчасовой экспозиции провести побелку перегородок, стен и др. 20% взвесью свежегашеной извести, а также применяют дезсредства, обладающие фунгицидными свойствами.

Лица, работающие с инфицированными животными, должны быть проинструментированы по технике личной безопасности, обеспечены спецодеждой, моющими средствами и необходимым инвентарем по уходу за животными.

Спецодежду ежедневно после работы дезинфицируют. Хозяйство объявляют благополучным через 2 месяца после последнего случая выявления клинически больных животных.

**Бессимптомное миконосительство животных, обусловленное грибами-дерматофитами.** Грибы-дерматофиты, попав на кожный покров животного-хозяина, не всегда вызывают патологический процесс, однако сохраняют свою жизнеспособность, пребывая в покоящейся форме. В таком случае речь идет о бессимптомном миконосительстве. Такое состояние не является инфекцией (болезнью), однако при определенных условиях (снижение резистентности организма, травмы и т. п.) возбудитель может проявить свои патогенные свойства и вызвать инфекционный процесс. Различные виды животных могут являться носителями зооантропофильных дерматофитов (*M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*), геофильных (*M. gypseum*), а в ряде случаев — антропофильного возбудителя *T. rubrum*. Животное может оставаться бессимптомным миконосителем неопределенно долгое время, не проявляя клинических признаков заболевания, однако представляя опасность для заражения других животных и человека. Кроме того, животные-миконосители являются источником контаминации внешней среды,

помещений и предметов обихода, а также воздуха, создавая тем самым стационарный инфекционный очаг.

Люди, контактирующие с животными-миконосителями (владельцы домашних животных, обслуживающий персонал конюшен, звероводческих и сельскохозяйственных предприятий), подвергаются постоянному риску заражения дерматофитозом. Дети наиболее подвержены риску заражения дерматофитозами при контактах с домашними животными. Таким образом, животные-миконосители во многом обуславливают неблагополучную ситуацию по дерматофитозам человека. Бессимптомное миконосительство регистрируется у многих видов домашних животных, а масштабы его распространения носят массовый характер. По данным ряда авторов, количество животных-миконосителей среди кошек достигает 75–88%, среди собак — 36–66%, среди кроликов, грызунов — 26–61%, среди КРС — 59%. Распространению миконосительства способствуют контакты с бродячими животными, неудовлетворительные санитарные условия содержания, скученное содержание животных (в питомниках, у заводчиков и т.п.). Большинство животных потенциально подвержено риску вовлечения в бессимптомное миконосительство.

**Микозы, вызываемые дрожжевыми грибами.** «Дрожжи» — собирательный термин, объединяющий грибы, для которых характерно одноклеточное строение таллома, размножение почкованием, отсутствие истинного мицелия и образование псевдомицелия, состоящего из неотделившихся при почковании клеток. Многие виды дрожжевых грибов (за исключением возбудителей опасных глубоких микозов) являются частью нормальной микробиоты кожного покрова и слизистых оболочек животных и обладают слабовыраженными патогенными свойствами. В макроорганизме в естественных усло-

виях они занимают сапробионтную нишу, не причиняя вреда организму-хозяину. Однако при снижении естественной резистентности макроорганизма дрожжи могут вызывать инфекционный процесс, являясь, таким образом, оппортунистическим патогеном.

Важной биологической особенностью дрожжевых грибов является их способность образовывать биопленки — многоклеточные структуры, обеспечивающие защитные и трофические функции в условиях макроорганизма. Биопленки также обуславливают высокую устойчивость дрожжевых грибов к антимикотикам, что затрудняет терапию дрожжевых микозов.

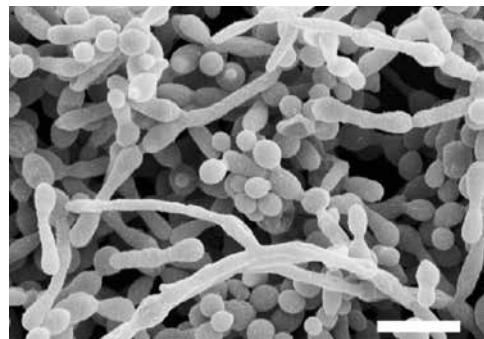


Рис. 15. Зрелая (48 ч.) биопленка *Candida albicans*. Биопленки состоят из дрожжевых, гифальных и псевдогифальных элементов. СЭМ

Наибольшее значение для ветеринарии имеют микозы, вызываемые дрожжевыми грибами родов *Candida* и *Malassezia*. Возбудители опасных глубоких микозов — *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* — являются диморфными, т. е. образуют как дрожжевую, так и мицелиальную форму.

## *Candida*-инфекции

Грибы рода *Candida* могут вызывать кандидоз кожи и слизистых оболочек

пищеварительного, дыхательного и мочеполового трактов, а также генерализованные поражения. Основным возбудителем является вид *C. albicans*, однако микоз может быть вызван и другими видами рода *Candida*: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* и др.

Кандидозом болеют многие виды животных, однако в наибольшей степени ему подвержены птицы, в меньшей — собаки, кошки, лошади, КРС.

Основанием для постановки диагноза и назначением антифунгальной терапии служат наличие клинических признаков, обнаружение элементов гриба при микроскопии патологического материала и результаты культурального анализа.

При микроскопии патматериала обнаружают округлые, овальные почкающиеся дрожжевые клетки, фрагменты псевдомицелия. Для выделения грибов рода *Candida* используют обычные микологические среды (сусло-агар, среду Сабуро), температура инкубирования от 26 до 36°C. Критерием для видовой идентификации *C. albicans* является тест на образование ростковой трубки в присутствии сыворотки крови. При росте на диагностической *Candida*-среде с висмутом виды *C. albicans*, *C. krusei* образуют колонии агатово-черного цвета, *C. guillermondi*, *C. glabrata* — темно-коричневые, *C. lipolytica* — светло-коричневые или желтовато-коричневые колонии.

На среде Сабуро *Candida albicans* образует белые, бежеватые, гладкие или слегка морщинистые колонии сметанообразной консистенции. В стареющих культурах вокруг колоний в толще среды заметна зона мицелиального роста. При микроскопии культуры обнаруживают почкающиеся клетки округлой или овальной формы, 3–6 мкм. Присутствует псевдомицелий с гроздьями бластоконидий, располагающихся вдоль гиф с определенными

интервалами. В стареющих культурах образуются темные, округлые, терминальные хламидоспоры.



Рис. 16. Колония *C. albicans* (среда Сабуро)

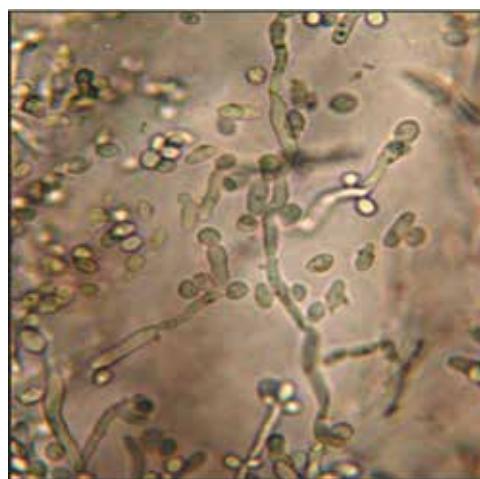


Рис. 17. Псевдомицелий, почкающиеся дрожжевые клетки *C. albicans*

Эффективность терапии *Candida*-инфекции зависит от *in vitro* тестирования культур на чувствительность к противогрибковым препаратам.

**Грибковый мастит крупного рогатого скота.** Мастит — полиэтиологическое заболевание, которое определяется как воспаление паренхимы молочных желез. Характеризуется физическими, химическими и, как правило, бактериологиче-

скими изменениями в молоке и патологическими изменениями в тканях молочной железы. Возникновение болезни является результатом взаимодействия между тремя основными факторами: инфекционным агентом, состоянием защитных сил организма животного и окружающей средой.

Мастит является глобальной проблемой, так как он отрицательно влияет на здоровье животных, качество молока, экономику производства молока. По оценке Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), мастит является наиболее распространенным инфекционным заболеванием молочного скота и с экономической точки зрения наиболее разрушительным. При этом экономические потери постоянно растут. Так, если в 1976 г. ежегодно потери от мастита в США оценивались в 1,294 млрд USD, то в настоящее время они достигают, по различным оценкам, около 2 млрд USD. Потери происходят из-за снижения производства молока, уничтожения молока, преждевременной выбраковки дойных коров, затрат на ветеринарное обслуживание, использование антибиотиков.

Основными формами заболевания является клинический и субклинический мастит.

*Клинический мастит* приводит к изменению органолептических свойств, химического состава и внешнего вида молока, снижению уровня молочной продуктивности и возникновению кардинальных признаков воспаления (боль, отек и покраснение, с повышением температуры или без таковой в инфицированных молочных железах). Это легко визуально обнаружить при осмотре животного.

Что касается обнаружения *субклинического мастита*, то это более сложная задача, потому что клинические при-

знаки чаще отсутствуют и не являются очевидными. Диагностика субклинического мастита является проблемой в молочном животноводстве и в ветеринарной практике. Субклиническая форма встречается в 15–40 раз чаще, чем клиническая форма, обычно предшествует клинической форме и имеет хроническое течение. При этом важно отметить, что животные с субклиническим маститом остаются постоянным источником инфекции для маточных стад.

Помимо экономического ущерба маститное молоко может быть угрозой для здоровья человека из-за загрязнения патогенными микроорганизмами или их токсинами. Кроме того, в таком молоке могут быть остатки антибиотиков, что может привести к серьезным реакциям у людей, страдающих аллергией на антибиотики, и развитию и селекции устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов.

Грибковый мастит характеризуется воспалением внутренней сети протоков вымени или молочной железы, вызванным грибами. Основным спектром грибковой инфекции являются дрожжи *Candida spp.*, реже *Cryptococcus spp.*, *Rhodoturulla spp.*, *Sacharomyces spp.*, *Trichosporon spp.*, *Geotrichum spp.*, *Aerobasidium spp.* и др. Также встречаются грибковые маститы, вызванные оппортунистическими мицелиальными грибами рода *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria*.

Клинические симптомы грибкового мастита крупного рогатого скота характеризуются повышением температуры тела животного, отечностью и покраснением вымени, выделением воспалительного экссудата; наблюдаются болевая реакция при надавливании на вымя и соски, изменение количества и состава молока. В наиболее тяжелой форме проявляется воспаление одной или двух четвертей вымени.



Рис. 18. Клинические симптомы грибкового мастита крупного рогатого скота

Симптомы при субклиническом мастите практически отсутствуют. Заболевание можно обнаружить только методом тестирования молока на количество соматических клеток. Диагноз подтверждается только при выявлении грибков в молоке или гистологическим исследованием, подтверждающим наличие в пораженной ткани молочной железы гиф и спор грибов.

Грибковый мастит обычно возникает из-за неконтролируемого применения антибиотиков при лечении лактирующих животных, вследствие загрязнённой окружающей среды, при низких санитарно-гигиенических условиях содержания животных.

Профилактика мастита выполняется легко и не требует больших затрат: строго соблюдать правила гигиены до и после доения, вымя, доильный аппарат обрабатывать дезинфицирующими растворами.

При лечении грибкового мастита применяют нистатин в дозе 10 г/сут., соски и вымя после окончания доения дезинфицируют раствором повидина

с йодом, ежедневно в течение 15 дней. Также можно применить и другие противогрибковые препараты, такие как Амфотерицин, Клотrimазол, Фторцитозин, Миконазол и Полимиксин согласно инструкции по применению.

### Глубокие микозы крупного рогатого скота

**Аспергиллезу** подвержены практически все виды животных. Основным возбудителем является вид *Aspergillus fumigatus*, реже виды *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. candidus*, *A. deflectus*, *A. terreus* и др. Эти виды широко распространены во внешней среде, где ведут сапрофитный образ жизни, однако при попадании в организм животных при благоприятных условиях проявляют патогенные свойства и вызывают инфекционный процесс. Грибы синтезируют протеолитические ферменты (в частности эластазу), а также эндотоксины, обладающие гематолитическими и токсическими свойствами. Многие

виды этого рода термотолерантны, способны расти при 40°C и –20°C.

Заражение происходит через дыхательные пути и пищеварительный тракт. Во многих случаях источником возбудителя являются растительные корма (зерно, сено), сильно контаминированные спорами грибов рода *Aspergillus*. Интенсивность инфекционного процесса зависит от степени резистентности макроорганизма и количества спор гриба, попавших в организм.

Клинические признаки, как правило, неспецифичны. У крупного рогатого скота аспергиллез чаще всего протекает в форме микотических abortов, которые спорадически поражают лишь небольшую часть поголовья стада, особенно в зимний период.

Способ отбора патологического материала для микологического исследования зависит от локализации заболевания. При микроскопии препаратов патматериала в КОН могут быть обнаружены характерные для рода *Aspergillus* конидиальные головки, а также мицелий. Для выделения культуры проводят посев на среду Сабуро, сусло-агар, агар Чапека. Следует учитывать, что селективные добавки с циклогексимидом ингибируют рост грибов рода *Aspergillus*. Посевы инкубируют при 26–28°C.

**Terапия** при инвазивном аспергиллезе, как правило, малоэффективна. Имеются сообщения о положительных результатах при использовании итраконазола (10 мг/кг, ежедневно, до клинического излечения), липосомального амфотерицина В (1 мг/кг, 3 раза в неделю в течение 4 недель до достижения кумулятивной дозы 12 мг/кг), тиабендазола (10–20 мг/кг перорально 2 раза в день). При локализации в носовой полости рекомендуют промывание с применением анти-микотиков азолового ряда (в частности энилконазолом). При кожной форме аспергиллеза птиц положительные ре-

зультаты дает применение тербинафина в дозе 10–15 мг/кг перорально, 2 раза в день. Для наружной терапии используют энилконазол, клотrimазол.

Эффективность терапии во многом зависит от *in vitro* тестирования культур на чувствительность к противогрибковым препаратам.

### Характеристика основных видов возбудителей аспергиллеза

***Aspergillus fumigatus*.** Колонии быстрорастущие, плоские, темного сине-зеленого цвета, порошистые. Конидиеносцы гладкостенные, гиалиновые, в верхней части могут быть светло-зелеными, заканчиваются колбовидным вздутием. Конидиеносные клетки (фиалиды) на вершине конидиеносца располагаются в один ярус, направлены вверх, покрывают 2/3 части вздутия конидиеносца. Конидии от округлых до овальных, 2–3 мкм, шероховатые, в цепочках, формирующих колонку. В молодых конидиальных головках располагаются радиально.

***Aspergillus flavus*.** Колонии быстрорастущие, пушистые, цвет варьирует от желто-зеленого до темно-зеленого. Конидиеносцы шероховатые, гиалиновые. Конидиеносные клетки 1–2-ярусные, покрывают всю площадь конидиального вздутия. Конидии округлые, овальные, шероховатые, 3–4 мкм. Цепочки конидий расходятся радиально.

***Aspergillus niger*.** Колонии быстрорастущие, черного цвета, порошистые. Реверс желтый. Конидиеносцы гладкостенные, гиалиновые или светло-коричневые.

### Микотический аборт крупного рогатого скота

Различные виды плесневых грибов и дрожжей вовлечены в микотический аборт крупного рогатого скота. Большинство из этих агентов — сaproфитные грибы, встречающиеся во влажных орга-

нических средах, таких как почва, сено и некачественный силос.

Вид *Aspergillus fumigatus* — наиболее часто выделяемый гриб, на долю которого приходится от 60 до 80% микотическихAbortов.

Другие виды *Aspergillus*, включая *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* и *Aspergillus nidulans*, встречаются реже. Зигомицеты составляют вторую наиболее часто встречающуюся группу: к ним относятся *Absidia corymbifera*, *Absidia ramosa*, *Mortierella wolfii*, *Rhizomucor pusillus* и *Rhizopus arrhizus*.

*Pseudallescheria boydii*. Виды рода *Penicillium*; аноморфные виды, такие как *Curvularia geniculata*, *Exophiala jeanselmei* и *Wangiella dermatitidis*, и дрожжи, обычно рода *Candida* или *Torulopsis*, составляют большую часть остальных встречающихся грибов. Частота встречаемости различных грибов варьирует и зависит от географического региона.

Частота микотических Abortов крупного рогатого скота колеблется в широких пределах, от 2 до 20%. Обычно бывает спорадическим, но некоторые исследования показали, что микотические агенты являются наиболее часто диагностируемой причиной Abortов крупного рогатого скота.

Редко в стаде поражается более 10% беременных коров. Возраст коровы не является предрасполагаемым фактором к микотическому Abortу. В Северном полушарии большинство микотических Abortов приходится на зимние и весенние месяцы. Скученное содержание крупного рогатого скота в этот период и вскармливание их некачественным заплесневелым кормом, сеном и силосом представляют наибольший риск проявления плацентарной инфекции, в результате происходит Abort на 7–8-м месяце.

Ворота проникновения грибковых агентов неизвестны, однако наибо-

лее вероятными путями являются дыхательный и желудочно-кишечный тракт. Хотя большинство грибковых спор достигают нижних дыхательных путей и задерживаются там, предполагается, что некоторые из них могут проникнуть в кровеносные сосуды через альвеолярные перегородки и через систему кровообращения достигнуть плаценты.

Инфекции рубца, сычужные язвы и поражения кишечника также могут быть факторами, предрасполагающими к гематогенному проникновению инфекта в матку.

Считается, что тематогенный путь является основным путем инфекции, поскольку поражение первоначально развивается в плацентомах, а впоследствии проникает в межплацентарное пространство между семядолями. Также могут быть задействованы ткани плода, в первую очередь кожа и легкие. Иногда происходит поражение мозга или печени.



Рис. 19. Микотический Abort, вызванный грибом рода *Aspergillus*. Многочисленные желтые бляшки на abortированном плоде

Некоторым исследователям удалось экспериментально вызвать микотический Abort путем внутривенного введения грибных спор, однако интратрахеальное и пероральное введение не привело к успешному воспроизведению заболевания.

После аборта большое количество грибковых элементов всасывается из матки, вызывая у коров острую эмболическую пневмонию. Обычно это происходит через 2–4 дня после аборта.

Плацента является наиболее полезным образцом для точной диагностики микотического аборта. Если это возможно, необходимо всю плаценту происследовать, поскольку инфекция может быть ограничена только частью плаценты. Плод или ткани плода, особенно кожа, легкие и съечужное содержимое также являются полезными диагностическими образцами. Соскобы с плаценты и пораженной кожи, съечужное содержимое следует исследовать на наличие грибковых гиф, которые легко визуализируются микроскопически. Наличие почкования дрожжей, псевдомицелий или пигментированные гифы могут предполагать инфекцию, вызванную дрожжами или одним из дерматогенных видов грибов соответственно.

Гистологические исследования также позволяют обнаружить элементы гриба в исследуемых образцах. Специфического антимикотического лечения абортированных коров, как правило, не требуется.

Есть предположение, что микотический аборт связан с использованием искусственного оплодотворения: в сперме были обнаружены различные виды грибов, в том числе плесневых. Связан ли это с загрязнением или контаминацией, определяется тщательным исследованием семенного материала, с исключением из рациона животных заплесневелых кормов.

**Кокцидиоидомикоз** — контагиозный особо опасный микоз многих видов животных, характеризующийся гранулематозным (локальным или дессимиинированным) поражением

легочной ткани с преимущественным поражением лимфатических узлов органов дыхания. К заболеванию восприимчив и человек. Из домашних животных к микозу восприимчив крупный рогатый скот, овцы, собаки, кошки.

Возбудителем является почвенный гриб *Coccidioides immitis*, обитающий преимущественно в песчаных почвах, в условиях повышенной влажности и высокой температуры окружающей среды. Природным резервуаром гриба являются грызуны. Эндемичными ареалами гриба являются Южная и Центральная Америка и юго-западные области США. В РФ заболевание практически не встречается.

Инфекция передается аэрогенно, при вдыхании пыли, содержащей споры грибов, с дальнейшим развитием бронхопневмонии. В последующем возможно диссеминирование возбудителя в другие ткани — кожу, подкожную клетчатку, кости, суставы, висцеральные органы.

Клинически кокцидиоидомикоз проявляется в сухом кашле, который через 1–3 недели после инфицирования становится влажным. У животных может наблюдаться лихорадка, снижение веса, хромота, болезненные костные припухлости. Поражения глаз проявляются в виде кератита,uveита, слепоты. Желудочно-кишечные расстройства, генерализованная лимфоаденопатия встречаются реже.

Кожные поражения, как правило, множественные и практически всегда появляются в местах костных опухолей. Поражения проявляются в форме узелков, папул, язв, абсцессов, дренажных каналов. При вскрытии выявляют гранулематозный процесс в бронхиальных и медиастинальных лимфатических узлах и легких.

Диагноз ставят на основании цитологического или гистологического обнаружения гриба в патматериале (препараторы в КОН, окрашенные препараты по Мак-Манусу, Граму–Вейгерту). Гриб может присутствовать в форме сферулы (диаметром 20–200 мкм) или в форме эндоспоры (2–5 мкм). Сферулы, заполненные эндоспорами, часто обнаруживаются в экссудатах из дренирующих кожных поражений.

Выделение культуры гриба может проводиться только в лабораториях с необходимым уровнем биологической безопасности. Также для диагностики используют серологические тесты: пробирочный преципитиновый тест, обнаруживающий главным образом IgM, и РСК, обнаруживающую главным образом IgG.

Для терапии применяют длительные курсы антифунгальных препаратов системного действия. Прогноз лечения осторожный.

**Характеристика возбудителя *Coccidioides immitis*.** Колонии двух типов. 1. Мицелиальная форма (среда Сабуро, 25°C): колонии плоские, бархатисто-пушистые, затем мучнистые, серовато-белые, состоящие из септированного мицелия, с многочисленными прямоугольными артроспорами длиной 4–5 мкм, разделенными клетками-дизьюнктарами. Иногда встречаются округлые хламидоспоры. 2. Дрожевая форма (37°C): колонии гладкие, лишенные воздушного мицелия, состоят из дрожжеподобных клеток до 7 мкм в диаметре и коротких нитей, могут встречаться прямоугольные артроспоры.

**Риск для человека.** Прямая передача возбудителя от животных к человеку встречается очень редко. Мицелиальная форма гриба высоковирулентна.

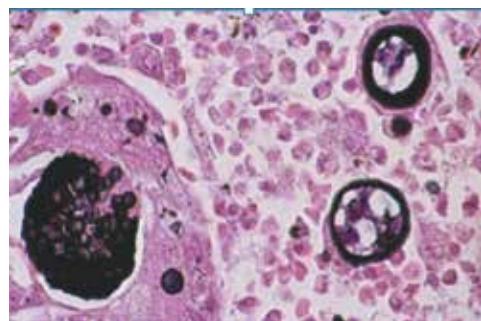


Рис. 20. Тканевая форма *Coccidioides immitis*. Сферула с высвобождающимися эндоспорами



Рис. 21. Мицелиальная форма *Coccidioides immitis* (среда Сабуро)



Рис. 22. Артроконидии *Coccidioides immitis*, разделенные клетками-дизьюнктарами

## Риноспоридиоз

Возбудитель — *Rhinosporidium seeberi*, по биологической классификации относящийся к отделу *Mesomycetozoa* царства Простейшие (*Protozoa*). Природный резервуар возбудителя не установлен. Возбудитель распространен в определенных климатических зонах по всему миру.

Риноспоридиозом болеют лошади, крупный рогатый скот, собаки, птицы, восприимчив и человек. Почти все случаи этого заболевания зафиксированы у самцов. Клинически микоз проявляется в образовании кровоточащих лобулярных полипов, пролиферирующих в носовой полости. Заболевание сопровождается чиханием, расстройством дыхания.

**Особенности диагностики.** На питательных средах возбудитель не растет. Постановку диагноза осуществляют на основании микроскопического обнаружения возбудителя в патматериале. Для лабораторного исследования отбирают экссудат из носовой полости или полипы. Для микроскопии готовят препараты в КОН или исследуют гистопатологические препараты. В положительных случаях обнаруживают сферические спорангии диаметром 50–100 мкм и более. Спорангии содержат тысячи эндоспор диаметром 7–9 мкм. Освободившиеся из спорангия споры инкапсулируются в мукоидную субстанцию и остаются в эпителии.

**Особенности терапии.** Терапия риноспоридиоза заключается в хирургическом удалении полипов. Для предотвращения реинфекции и распространения возбудителя применяют местные инъекции амфотерицина В (100 мг в 3 мл диметилсульфоксида).

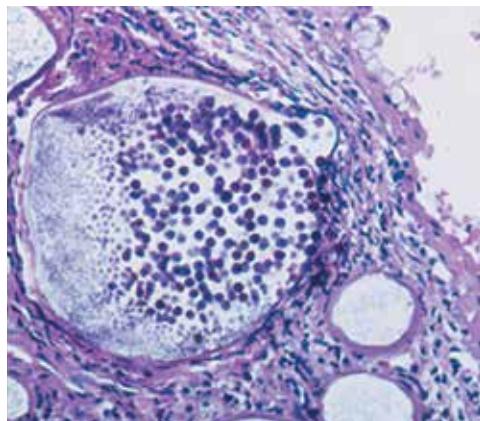


Рис. 23. Спорангий *Rhinosporidium seeberi* в пораженных тканях

## Бактерии, маскирующиеся под актиномицеты и нокардиоз

Актиномицеты — это группа аэробных и анаэробных бактерий отряда *Actinomycetales*. Отряд *Actinomycetales* включает филогенетически разнообразные, но морфологически сходные аэробные и анаэробные бактерии, которые обладают нитевидными ветвящимися структурами, которые фрагментируются на бациллярные или кокковидные формы.

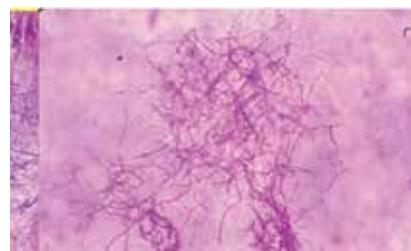
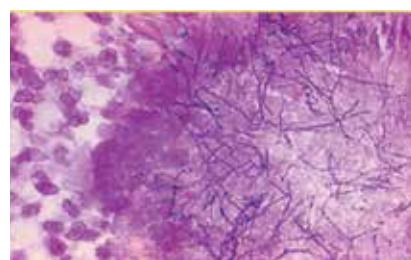


Рис. 24–25. Актиномицеты под микроскопом

Название «актиномикоз» означает «лучевой гриб», и эти организмы могут напоминать грибы из-за своего нитевидного вида. Аэробные актиномицеты — большая разнообразная группа грамположительных бактерий. Виды, вызывающие заболевания человека и животных, включают роды *Actinomyces*, *Nocardia*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Streptomycetes* и *Corynebacteria*. И *Actinomyces*, и *Nocardia* вызывают схожие клинические признаки, поражая легкие, кости и суставы, мягкие ткани и центральную нервную систему. Отличительным признаком обеих инфекций является образование абсцесса, хроническое течение заболевания сопровождается развитием воспалительных гранулем (актиномикомы). Длительность инкубационного периода — от нескольких недель до года.

Чаще всего актиномикоз встречается у крупного рогатого скота и свиней, реже у других сельскохозяйственных животных. Клиническая картина у крупного рогатого скота определяется местом локализации процесса, степенью вирулентности возбудителя и резистентностью организма животного.

Основным возбудителем актиномикоза крупного рогатого скота является *Actinomyces bovis*.

Причиной возникновения актиномикоза является патогенный инфект *Streptothrix actinomyces*, который живет на стеблях и колосьях злаковых растений. В организм гриб проникает через поврежденную слизистую оболочку ротовой полости и кожи. Возбудитель заболевания, проникший в организм, образует друзы и вызывает медленное развитие воспалительного процесса. На месте первичного узелка развиваются грибные нити, которые образуют в окружающих тканях новые узелки. Так возникают крупные дольки-узлы (актиномикомы), в центре которых появляются

очаги размягчения вследствие дегенерации и нарушения кровообращения, а затем образуются абсцессы. Актиномикомные поражения у крупного рогатого скота локализуются в области головы, поражаются верхняя и нижняя челюсти, межчелюстное пространство, подчелюстные лимфоузлы, костная ткань, но могут актиномикомы возникнуть и на конечностях, вымени и др.

Специфический признак актиномикоза — плотная опухоль, в дальнейшем образование свищей, из которых выделяется сметанообразный желтоватый с желто-серыми крупинками гной с дружами величиной с просяное зерно, который затем становится кровянистым с примесью кусочеков отторгаемой ткани. Актиномикомы в глотке и гортани ведут к затруднению дыхания и приема корма. Температура тела повышается в тех случаях, когда болезнь осложняется гнилостной микрофлорой или происходит генерализация процесса.



Рис. 26–27. Клиническая картина актиномикоза у коров. Образование актиномикомы в области головы

**Особенности диагностики.** Диагноз ставится на основании клинической картины, микроскопии и окраски содержания актиномиком и выделения культуры возбудителя. При микроскопии друз наблюдают лучистые образования, состоящие из нитей актиномицета с колбовидным утолщением от центра к периферии.

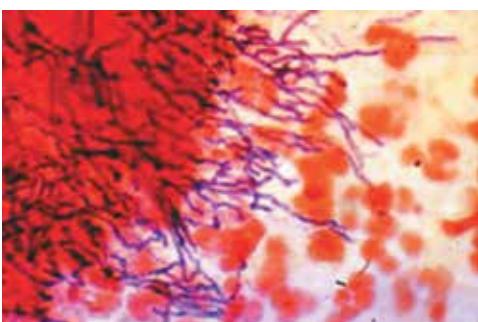
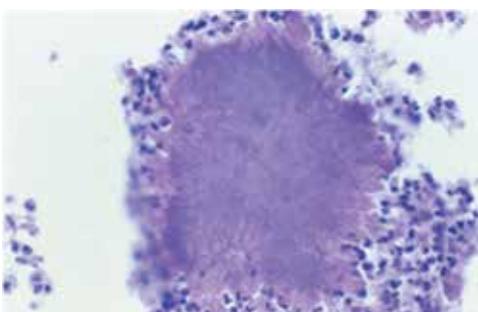


Рис. 28–29. Прямое микроскопирование.  
Вверху: актиномикозная гранулема.  
Внизу: ветвящиеся грамположительные нити по краю гранул

Для выделения культуры гной из актиномиком разбавляют физиологическим раствором, центрифицируют, осадок промывают стерильным физиологическим раствором и засевают на питательные среды. Возбудитель — факультативный анаэроб, рост стимулируется дополнительным снабжением CO<sub>2</sub>. Посевы культивируют в аэробных и анаэробных условиях при 37°C. Для получения аэробных культур используют кровяной и сывороточный МПА и агар Сабуро.

Для получения анаэробных культур используют среду Китт–Тароцци, а также полужидкую (0,3–0,5%) МПА с 1% глюкозы, под слоем стерильного вазелинового масла, при этом посев проводят в толщу среды.

**Характеристика возбудителя *Actinomyces bovis*.** Рост колоний обычно наблюдается через 1–2 недели. На полужидкой среде МПА колонии желтовато-белые, в толще среды имеют клиновидные выступы. Зрелые колонии (7–14 сут.) обычно шероховатые, рыхлые по текстуре, иногда красного цвета. При микроскопии обнаруживают тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки 0,2–1,0×2–5 мкм и нити длиной 10–50 мкм с настоящим ветвлением. Нити на концах раздутые или булавовидные. Короткие палочки часто с булавовидными концами, одиночные, в парах, часто V-образной и Y-образной конфигурации, иногда в коротких цепочках.

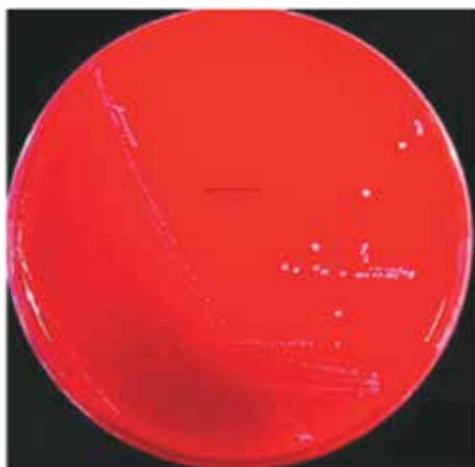


Рис. 30. Маленькие гладкие выпуклые колонии на кровяном агаре. 24-суточная анаэробная культура *Actinomyces bovis*, выращенная при 37°C

Терапия актиномикоза, как и нокардииоза, длительная, требует применения антибиотиков парентерально и перорально. В некоторых случаях рекомен-

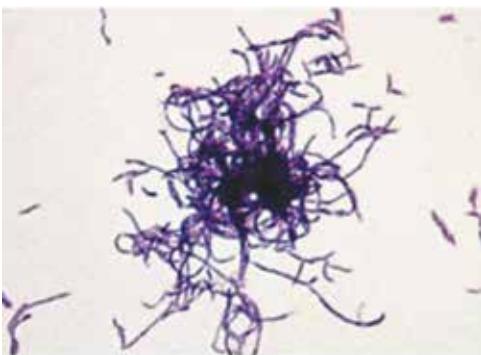


Рис. 31. Микроскопическая картина выращенной культуры (окраска по Граму)

дуется хирургическое иссечение пораженных тканей.

**Нокардиоз крупного рогатого скота («бычий сап»).** Нокардиозы — хроническое заболевание сельскохозяйственных, домашних животных и человека, вызываемое грибками, принадлежащими к роду *Nocardia*. Источником заражения является почва и растительные остатки. Наиболее распространенный путь заражения — через травмы кожного покрова, реже — ингаляторный и алиментарный. При подкожной локализации поражаются лимфоузлы, подкожная соединительная ткань, образуются абсцессы, в которых формируются свищевые ходы с гнойным отделяемым. Тяжелому поражению могут подвергнуться и молочные железы, и различные внутренние органы животного с образованием гнойных гранулематозных узлов. При лабораторном исследовании обнаруживают ветвящиеся гифы микроорганизма, а также желтоватые гранулы (друзы), сходные с друзьями, обнаруживаемыми при актиномикозе.

Нокардиоз крупного рогатого скота впервые описал Суанайон в 1829 г. во Франции. Общепринятый термин «нокардиоз» связан с именем французского ученого Э. Нокара, впервые выделившего и давшего подробную характеристику возбудителя. Нокардиоз встречается в Европе, Африке, Америке.

Экономический ущерб складывается из затрат на терапию больных животных, проведение профилактических мероприятий и потерю от снижения продуктивности.

Основными возбудителями нокардиоза крупного рогатого скота являются виды *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia caviae* (мастит КРС), *Nocardia farcinica* — данный вид в основном встречается на африканском континенте.

Возбудители нокардиоза при выращивании на среде Сабуро, сусло-агаре или мясопептонном агаре в аэробных условиях при температуре 28–37°C формируют гладкую или зернистую колонию с тестообразной консистенцией и выраженной складчатостью. К 20-му дню диаметр колонии достигает 8–10 мм. Цвет колонии желтоватый, оранжевый, а иногда даже красный. При микроскопическом исследовании (окраска по Граму) обнаруживаются тонкие ветвящиеся нити толщиной до 1 мкм, с четко выраженной сегментацией, которые быстро распадаются на палочковидные и кокковые элементы диаметром около 1 мкм.

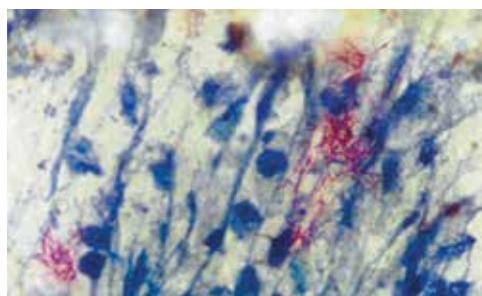


Рис. 32. Микроскопия: ветвящиеся нити *Nocardia spp.* расположены в виде комков или кружевной сети, которые распадаются на бациллярные формы

Для эффективной терапии применяют антибиотики после тестирования культур на чувствительность. Большинство протестированных штаммов *in vitro* чувствительны к циклосерину,

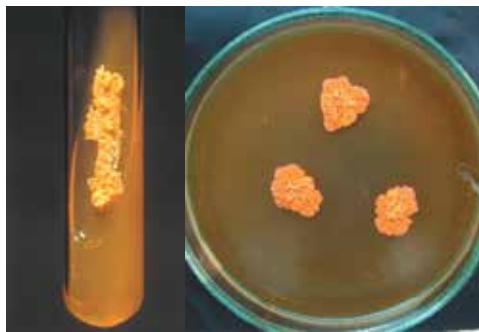


Рис. 33–34. Колонии *Nocardia spp.*  
(усло-агар)

дапсону, амикацину, доксициклин HCl, окситетрациклин HCl и сульфату паромомицина (64 мкг/мл). Эффективны сульфаниламидные препараты.

Хирургическая процедура акцентирована на санацию раны, дренаж, промывание поражений антисептическими растворами, в частности 0,5% хлоргексидином или 1% йодом.

### Проблема устойчивости к противогрибковым препаратам у различных видов животных и птицы

Применение противогрибковых препаратов для терапии микозов у животных в Российской Федерации носит стихийный характер. Ситуацию осложняет то, что для ряда видов животных нет научно обоснованных дозировок и антимикотиков длительной противогрибковой терапии. Кроме того, в нашей стране основные противогрибковые препараты подлежат безрецептурной продаже. Эти обстоятельства, безусловно, вносят свой вклад в развитие резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам, в том числе в ветеринарии.

Возрастает количество резистентных к противогрибковым препаратам штаммов *C. albicans*, *C. parapsilosis*,

*C. tropica*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, а также штаммов дерматофитов *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* и других видов. Эти виды являются основными возбудителями грибковых инфекций у человека и животных. Примечательно то, что некоторые резистентные ко многим противогрибковым препаратам штаммы этих видов обнаружены во внешней среде. Кроме того, дерматофиты способны долгое время сохраняться в почве, а также циркулировать в популяции животных в виде бессимптомного (скрытого) макроносительства. Такие животные-носители, не имея признаков заболевания, способны стать источником заражения других животных и человека. К сожалению, актуальных достоверных данных о заболеваемости сельскохозяйственных и домашних животных грибковыми инфекциями, которые обусловлены оппортунистическими грибами, для Российской Федерации очень мало. Еще меньше данных о чувствительности возбудителей таких инфекций к противогрибковым препаратам.

### Литература

1. Аравийский Р., Горшкова Г. Практикум по медицинской микологии. Санкт-Петербург, 1995.
2. Ачкасова Т. и др. Актуальность эмерджентных инфекций. Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2012. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/aktualnost-emerdzhentnyh-infektsiy>.
3. Кашкин П., Лисин В. Практическое руководство по медицинской микологии. Л.: Медицина, 1983.
4. Королева В.П. Лабораторная диагностика возбудителей трихофитии крупного рогатого скота. Бюллетень ВИЭВ. 1976; 25: 49–52.

5. Курасова В., Костин В., Малиновская Л. Методы исследования в ветеринарной микологии. М.: Колос, 1971.
6. Лещенко В.М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. М.: Медицина, 1982.
7. Маноян М.Г., Панин А.Н., Овчинников Р.С. Ветеринарная и медицинская значимость зооантропофильных видов дерматофитов. Успехи медицинской микологии. М.: Национальная академия микологии, 2006; 8: 182–184.
8. Маноян М.Г., Овчинников Р.С., Панин А.Н. Миконосительство домашних животных — основной фактор распространения зооантропонозных дерматофитозов людей. Успехи медицинской микологии. 2007; 9: 311–314.
9. Маноян М.Г. и др. Резистентность возбудителей грибковых заболеваний к противогрибковым препаратам. Успехи медицинской микологии. 2018; XVIII (1): 40–44.
10. Маноян М.Г., Панин А.Н., Овчинников Р.С. Современные средства специфической профилактики и терапии дерматофитозов животных. Современная микология в России. 2 съезд микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008; 2: 354–355.
11. Определитель бактерий Берджи. Под редакцией Хоулта Д., Крига Н., Снита П.М. М.: Мир, 1997.
12. Панин А.Н., Маноян М.Г., Овчинников Р.С. Этиологическая структура зооантропонозных микозов. Успехи медицинской микологии. 1-й Всерос. конгр. по мед. микологии. М.: Национальная академия микологии, 2003; 2(1): 120–121.
13. Петрович С.В. Микозы животных. М.: Росагропромиздат, 1989.
14. Решедько Г., Стецюк О. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001; 3(4): 348–354.
15. Саркисов А.Х. и др. Диагностика грибных болезней животных. М.: Колос, 1971.
16. Саттон Д., Фотергилл А., Риальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001.
17. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Бином-пресс, 2003.
18. Сергеев Ю.В., Шпигель Б.И., Сергеев А.Ю. Фармакотерапия микозов. М.: Медицина для всех, 2003.
19. Ali-Stayeh M., Arda H., Hassouna M. Keratinophilic fungi on the hair of cows, donkeys, rabbits, cats and dogs from the West Bank of Jordan. *Mycopathologia*. 1988; 104(2): 109–121.
20. Arne P. Aspergillosis in birds. 1<sup>st</sup> Int. Vet. Mycol. Course. Nijmegen. 2013.
21. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Ed. by Kushwaha R., Guarro J. Bilbao. 2000; 104–108.
22. Blanco J., Garcia M. Present and future in the immunodiagnosis of the animal mycoses. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17: S23–S28.
23. Bond R. Superficial veterinary mycoses. *Clinics in Dermatology*. 2010; 28: 226–236.
24. Cabanes F. Animal dermatophytosis. Recent advances. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17: 8–12.
25. Campos-Nietto E. Principal dermatomycoses diagnosed at the Central National Laboratory for animal pathology diagnosis. *Boletin de la Sociedad Mexicana de micología*. 1978; 12: 125–130.
26. R. de Aguiar Cordeiro et al. Candida tropicalis isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. *Med. Mycol.* 2015; 53: 145–152.
27. Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal. Genet. Biol.* 2005; 42: 98–106.

28. Chermette R., Ferreiro L., Guillot J. Dermatophytoses in Animals. *Mycopathologia*. 2008; 166: 385–405.
29. Davey K., Campbell C., Warnock D. Mycological techniques. *J. Clin. Pathol.* 1996; 49: 95–99.
30. De Vroey C. Epidemiology of ring-worm (dermatophytosis). *Semin. Dermatol.* 1985; 4: 185–200.
31. Diseases and Resources by Species. URL: [www.cfsph.iastate.edu](http://www.cfsph.iastate.edu).
32. Ellis D. et al. Description of medical fungi. Adelaide. 2007.
33. Ellis D. Laboratory diagnosis of dermatophytosis. Women's and children's hospital. Adelaide. Australia.
34. Seyedmousavi S. et al. Emerging and epizootic fungal infections in animals. Springer International Publishing AG. Part of Springer Nature. 2018.
35. Emenuga V.N., Oyeka C.A. Epidemiology, health effects and treatment of cutaneous mycoses of goat and sheep from some Eastern States of Nigeria. *Am. J. of Infect. Dis. and Microbiol.* 2013; 1(6): 106–110.
36. Friedman D.Z.P., Schwartz I.S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. *J. Fungi.* 2019; 5: 67.
37. Fungal diseases. URL: [veteriankey.com/fungal-diseases](http://veteriankey.com/fungal-diseases).
38. Seyedmousavi S. et al. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med. Mycol.* 2018; 56(S1): 167–185.
39. Garcia M., Blanco J. Mycoses in domestic animals. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17: 2–7.
40. Gudding R., Lund A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Canadian Vet. J.* 1995; 36(5): 302–306.
41. Gupta A., Tomas E. New antifungal agents. *Dermatol. Clin.* 2003; 21(3): 565–576.
42. Hallen-Adams H.E., Suhr M.J. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*. 2017; 8(3): 352–358.
43. Hoog de G.S. et al. Atlas of clinical fungi. 2d ed. URL: [https://www.academia.edu/29912087/Atlas\\_of\\_clinical\\_fungi\\_2nd\\_edn\\_.G.S.\\_de\\_Hoog\\_J.\\_Guarro\\_J.\\_Gen%C3%A9\\_M.J.\\_Figuera](https://www.academia.edu/29912087/Atlas_of_clinical_fungi_2nd_edn_.G.S._de_Hoog_J._Guarro_J._Gen%C3%A9_M.J._Figuera).
44. Hungerford L., Campbell C., Smith A. Veterinary mycology laboratory manual. Iowa State University Press. Iowa. 1998.
45. Iliev I.D., Leonardi I. Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(10): 635–646.
46. Adimi P. et al. In-vitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in tehran. *Iran J. Pharm. Res.* 2013; 12(3): 537–545.
47. Kane J. et al. Laboratory handbook of dermatophytes. 1997.
48. Khalil R.H. et al. Branchiomyces demigrans infection in farm-reared Common Carp (*Cyprinus Carpio L.*) and Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) at different localities in Egypt, with special emphasis to the role of environmental stress factors. *Int. J. of Innov. Stud. in Aquatic Biol. and Fisheries.* 2015; 1(1): 15–23.
49. Limon J.J., Skalski J.H., Underhill D.M. Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe.* 2017; 22(2): 156–165.
50. Moriello K. Diagnostic techniques for dermatophytosis. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2001; 16(4): 219–224.
51. Mukherjee P.K. et al. Oral myco-biome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathog.* 2014; 10:e1003996.
52. Otcenasek M., Hubalek Z., Sixl W. Survey of dermatophytes in the hair of small mammals from Austria. *Folia parasitol. Praha.* 1980; 27(1): 83–87.
53. Perez J., Carrasco L. Histopathological diagnosis of mycoses in veterinary pathology. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17: 18–22.

54. Phaeohyphomycosis of saffron cod and other fish species. URL: [https://www.adfg.alaska.gov/static/species/disease/pdfs/fishdiseases/phaeohyphomycosis\\_of\\_saffroncod\\_and\\_other\\_fish.pdf](https://www.adfg.alaska.gov/static/species/disease/pdfs/fishdiseases/phaeohyphomycosis_of_saffroncod_and_other_fish.pdf).
55. Porcine Ringworm. NADIS. Animal Health Skills. URL: <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/pigs/porcine-ringworm/>.
56. Ramage G. et al. Candida Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*. 2005; 4(4): 633–638.
57. Ratajczak-Stefanska V., Maleszka R., Turek-Urasinska K. Microsporosis in the light of clinical and mycological examination. *Med. Mycol.* 2004; 11(1): 66–67.
58. Richardson M., Jones B. Therapeutic guidelines in systemic fungal infections. Current medical literature. 2004.
59. Rijs T. Mycology images. Colophon. 2017.
60. Scott D.W. Color atlas of farm animal dermatology. 2<sup>d</sup> ed. Hoboken. NJ: Wiley. 2018.
61. Schubach A., de Barros M.B.L., Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21: 129.
62. Siesenop U. Animal dermatophytosis. *Med. Mycol.* 2004; 11(1): 25.
63. Almeida-Paes R. et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Sporothrix brasiliensis is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8: e3094.
64. Batista-Duharte A. et al. Sporothrix brasiliensis induces a more severe disease associated with sustained Th17 and regulatory T cells responses than *Sporothrix schenckii* sensu stricto in mice. *Fungal. Biol.* 2018; 122: 1163–1170.
65. Suhr M.J., Banjara N., Hallen-Adams H.E. Sequence-based methods for detecting and evaluating the human gut mycobiome. *Lett. in App. Microbiol.* 2016; 62: 209–215.
66. Sympania M., Baxter M. Isolation of fungi from pelage of cats and dogs using the hairbrush technique. *Mycopathologia*. 1996; 134(3): 129–133.
67. Talbot J.J. et al. Azole resistance in canine and feline isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 42: 37–41.
68. Tell A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med. Mycol.* 2005; 1: 71–73.
69. Brilhante R.S. et al. Trends in anti-fungal susceptibility and virulence of *Candida spp.* from the nasolacrimal duct of horses. *Med. Mycol.* 2016; 54: 147–154.
70. Weitzman I., Summerbell R. The dermatophytes. *Clin. Microbial. Rev.* 1995; 8(2): 240–259.
71. Young G., Krasner R.I., Yudkofsky P.L. Interactions of oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *J. of Bacteriol.* 1956; 72: 525–529.
72. Zoonoses: Protecting People and Their Pets. Ed. by Dvorak G., Roth J.A. 1<sup>st</sup> ed. 2013.

## X. ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

Кальнов С.Л., Верховский О.А., Гребенникова Т.В., Кривонос А.В., Алипер Т.И.

### Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота

Перечень сокращенных названий

ТГЭ (TSE) — трансмиссивные губкообразные энцефалопатии

БКЯ (CJD) — болезнь Кройтифельдта—Якоба

ГЭ КРС (BSE) — губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота

ХИБ (CWD) — хроническая изнуряющая болезнь (диких жвачных животных, оленевых)

ИГХ — иммуногистохимический анализ

ИФА — иммуноферментный анализ

ИХА — иммунохроматографический анализ

кД — килодальтон

КРС — крупный рогатый скот

МАТ — моноклональное антитело

nvБКЯ (nvCJD) — новый вариант болезни Кройтифельдта—Якоба

н.п. — нуклеотидные пары

ПК — протеиназа К

рек-PrP — рекомбинантный прионный белок

САФ — скрепи-ассоциированные фибрillы

СГШШ — синдром Герцмана—Штредесслера—Шейнкера

PrP<sup>c</sup> — нормальный клеточный прионный белок

PrP<sup>sc</sup>, PrP<sup>res</sup>, PrP<sup>BSE</sup> — инфекционная изоформа прионного белка

PrP<sup>res</sup> — изоформа прионного белка, резистентная к обработке протеиназой К а.о.; а.а. — аминокислотный остаток; аминокислота

### Введение

Трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (ТГЭ) являются особым классом нейродегенеративных болезней, встречающихся как у человека, так и у животных [33]. Интерес научного сообщества к изучению ТГЭ был вызван прежде всего предположением, что единственным инфекционным агентом при этих заболеваниях является патологическая изоформа клеточного белка, без участия молекул ДНК или РНК. Это уникальное предположение, высказанное Стэнли Прузинером (Prusiner S.B., рис. 2) много лет назад, противоречило основной догме молекулярной биологии [31]. Тем не менее значительное количество экспериментальных данных практически подтвердило эту гипотезу, а автор стал лауреатом Нобелевской премии. Инфекционный агент белковой природы был обнаружен, охарактеризован и назван прионом (транслитерация от protein only infectious agent), а синонимом ТГЭ стали прионные болезни.



Рис. 1. Katherine O'Rourke (ARS USDA) и С.Л. Кальнов на Международной конференции PRION 2007, Эдинбург, Шотландия



Рис. 2. Нобелевский лауреат, открывший прионы, — S.B. Prusiner (справа), С.С. Рыбаков (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), О.А. Верховский на Международной конференции PRION 2007, Эдинбург, Шотландия

В середине 1990-х годов в Англии возникла эпизоотия губкообразной энцефалопатии среди крупного рогатого скота (ГЭ КРС) — так называемое бешенство коров. Вслед за этим в Англии, а позднее в странах Европы, Ближнего Востока, США и др. были зафиксированы случаи неизвестной формы болезни Крейцфельдта—Якоба (БКЯ) среди относительно молодых людей, получившие название «нового варианта БКЯ» (нвБКЯ). Потенциальная опасность распространения заболевания среди людей, более короткий инкубационный период и неотвратимая летальность заболевания стимулировали интенсивные научные исследования в этой области. Таким образом, классические исследования ГЭ КРС послужили формированию нового широкого спектра научных подходов и работ, остающимися актуальными до настоящего времени как в изучении инфекционных заболеваний, так и в смежных отраслях [32, 33].

## История открытия ГЭ КРС

В ноябре 1986 года в Центральной ветеринарной лаборатории г. Вейбридж (Великобритания) при исследовании мозга трех коров молочных пород была обна-

ружена новая нейрологическая болезнь КРС, названная губкообразной энцефалопатией КРС (ГЭ КРС, BSE). Обнаруженные при гистологическом анализе патологические изменения в нейронах мозга КРС поразительным образом совпадали с таковыми, выявляемыми у овец, пораженных скрепи — историческим архитипом всех известных до этого времени ТГЭ человека и животных. Случаи возникновения и обнаружения ГЭ КРС стремительно нарастили, и с 1987 года болезнь приняла характер эпидемии, достигнув максимума к апрелю 1993 года. Вскоре ГЭ КРС распространилась в странах Европы и далее по всему миру, включая США, Канаду, Японию и другие страны. Клинические признаки болезни выражались в нарушении поведенческих реакций зараженных животных, таких как атаксия, дизэстезия, рефлекторная гиперэстезия (ненормальная реакция на прикосновения и звуки и др.). Через 1–6 месяцев течения болезни животные становились неуправляемыми и подвергались убою.

## Эпидемиология ГЭ КРС. Источник инфекции и факторы риска

Дальнейшие масштабные исследования научного сообщества можно сравнить с научным детективом, в котором принимали участие профильные ученые-инфекционисты, ветеринарные врачи, аналитики и специалисты промышленных предприятий, задействованных в переработке мясной и молочной продукции. Изначально был проведен анализ двух типов КРС — мясной и молочной пород — с установленным диагнозом ГЭ КРС. Было показано, что болезни изначально подвержены в основном молочных породы Великобритании. В указанных стадах численностью до 100 голов

выявлялось от 20% зараженных животных и при численности стада до 200 голов инфицированы были до 50% поголовья, в то время как в стадах мясных пород эти цифры были близки к нулю. Далее были детально исследованы возможные факторы риска: компоненты, входящие в состав кормов, кормовые добавки, медикаментозные и вакциные препараты. Среди названных применяемых компонентов тщательно изучались и сравнивались с частотой возникновения случаев ГЭ КРС мясокостная мука (МКМ), различные типы вакцин, бактериальные антисыворотки, гормоны, пиретроидные и органофосфорные инсектициды и др. Было установлено, что наибольшее число случаев возникновения заболевания ГЭ связано с мясокостной мукой, входившей в рацион кормовых добавок молочных пород КРС, получавших ее с первых недель жизни, и практически отсутствовавшей в рационе КРС мясных пород. Специалисты провели расследование на предприятиях, производящих МКМ, и пришли к пониманию причин возникновения заболевания именно в Великобритании в 1985–1986 гг. В этот период в связи с экономическим кризисом в стране существенно подорожало электричество, что в свою очередь инициировало изменение прежних регламентов производства МКМ, когда термальная обработка мясных субпродуктов была заменена на процедуру экстракций компонентов дешевыми растворителями на основе бензина [43]. При этом экстракция жировых компонентов упала с 70% (в ранних 1970-х) до 10% (в 1980-х), что привело к резкому увеличению доли МКМ в кормовых добавках и совпало по срокам с первыми случаями трансмиссии губкообразной энцефалопатии у КРС. Опыт, полученный при исследованиях «мистической болезни коровьего бешенства», объем проведенных исследований и изучения структуры и функции возбудителя ГЭ

КРС стал классическим в дальнейшем изучении новых вариантов прионных болезней человека и животных.

Таким образом, ГЭ КРС — это прионное заболевание крупного рогатого скота, которое проявляется клиническими признаками заболевания центральной нервной системы, такими как необычное поведение, гиперреактивность и атаксия. В естественных условиях заболеванию губкообразной энцефалопатией подвержен крупный рогатый скот видов *Bos Taurus* и *Bos indicus*. ГЭ КРС неизлечима и является на 100% летальным заболеванием. Эпизоотологические данные и экспериментальные исследования передачи показывают, что инкубационный период составляет не менее 2 лет и может продолжаться более десяти лет, однако в среднем составляет 4–7 лет.

## Этиология прионных заболеваний. Биология и свойства прионного белка

В настоящее время гипотеза о том, что инфекционным агентом, вызывающим ТГЭ, изначально является протеазорезистентная изоформа нормального белка, принята большинством научного мирового сообщества. Накопленные экспериментальные данные говорят о том, что ген этого белка *PRNP* находится в геноме всех исследованных к настоящему моменту млекопитающих, а также цыплят, черепах, рыб, плодовых мушек *Drosophila melanogaster* и низших эукариот — дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Продуктом экспрессии *PRNP* является нормальный белок — PrP<sup>c</sup>, синтезируемый практически всеми видами клеток, кроме моноцитов [32, 33].

Возникновение болезни под воздействием неизвестных до настоящего времени факторов связано с изменением пространственной структуры белка PrP<sup>c</sup>.

Он трансформируется в изоформу с повышенным содержанием  $\beta$ -структур и уменьшенным количеством  $\alpha$ -спиральных участков по сравнению с нормальным состоянием и обозначается как PrP<sup>c</sup> (а также PrP<sup>res</sup>, PrP<sup>d</sup>). Следует подчеркнуть, что аминокислотная последовательность PrP<sup>c</sup> и PrP<sup>c</sup> абсолютно идентична. Вследствие такого конформационного перехода изменяются физические свойства нормального белка, что ведет к развитию патологического процесса.

Известны три формы прионных болезней у человека и животных: спорадическая, наследственная и инфекционная (табл. 1). Общими чертами патогенеза приведенных в таблице болезней являются быстро прогрессирующая деменция (слабоумие), церебральная атаксия (нарушение координации движений и равновесия) и 100% летальный исход [44].

## Нативный клеточный белок PrP<sup>c</sup>

В настоящее время данный термин употребляют для обозначения изоформы белка, образующейся при нормальном метаболизме клеток (PrP<sup>c</sup>, от англ. cell — ‘клетка’). У человека ген *PRNP*, кодирующий PrP<sup>c</sup>, находится на хромосоме 20, у мыши — на 2-й. Результатом его экспрессии является нормальный белок, и в зависимости от вида животных длина его полипептидной цепи несущественно колеблется (253 аминокислот (а.к.) у человека, 265 а.к. у коровы), обнаруживая высокий процент гомологии у млекопитающих (85–95%). Белок PrP<sup>c</sup> является гликопротеином, метаболический цикл которого начинается в эндоплазматическом ретикулуме, где происходит присоединение гидрофобного гликозилфосфотидили-

Таблица 1. Прионные болезни человека и животных

Болезнь	Хозяин	Пути передачи
Куры	человек	инфекция путем ритуального каннибализма
Болезнь Крейцфельдта-Якоба и инфекционная (иБКЯ, CJD)	человек	заражение путем инъекций гормона роста, пересадки мозговой оболочки и т.д.
Наследственная БКЯ (н. БКЯ, CJD)	человек	мутации в гене <i>PRNP</i>
Синдром Герстманна—Штойссера—Шайнкера (СГШШ)	человек	мутации в гене <i>PRNP</i>
Фатальная семейная инсомния (ФСИ) или наследственная смертельная бессонница (НСБ)	человек	мутации в гене <i>PRNP</i> (Д 178N, М 129)
Спорадическая БКЯ (сБКЯ, CJD)	человек	соматические мутации или спонтанная конверсия PrP <sup>c</sup> в PrP <sup>sc</sup>
Новый вариант БКЯ (нв БКЯ, nvCJD)	человек	заражение через пищевые продукты
Скрепи (Scrapie, Sc)	овцы, козы	заражение генетически предрасположенных особей
Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭ КРС, BSE)	крупный рогатый скот (КРС)	заражение через пищевые добавки, мясокостную муку (МКМ)
Атипичная губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (АГЭ КРС, аBSE)	крупный рогатый скот (КРС)	заражение через пищевые добавки, мясокостную муку (МКМ). Возбудитель аPrPd нерезистентен к протеазе К
Трансмиссивная энцефалопатия норок (ТЭН, TEM)	норки	заражение через корм от овец или коров; на основе мяса
Хроническая изнурающая болезнь (ХИБ, CWD)	олени, лоси	неизвестно
Губкообразная энцефалопатия семейства кошачьих (ГЭК)	кошки, леопарды, тигры	заражение через потребление инфицированной говядины или МКМ
Экзотическая энцефалопатия копытных	антилопы: куду, ньяла, орикс	заражение через МКМ в зоопарках

нозитольного якоря (ГФИЯ) и сахаров к одному или двум аспарагинам N180 и N196 — сайтам гликозилирования. Далее эти олигосахариды подвергаются модификации в аппарате Гольджи, поэтому в изолированном PrP<sup>c</sup> при электрофорезе различают обычно три полосы, соответствующие негликозилированной — 25 кДа, частично гликозилированной — 30 кДа и полностью гликозилированной форме PrP<sup>c</sup> — 32–40 кДа. После процессинга и фолдинга PrP<sup>c</sup> локализуется в мемbrane клетки, образуя кластеры в пределах микродоменов, так называемые рафты. Белок PrP<sup>c</sup> относят к рецепторным молекулам, имеющим слабую связь с внешним лепестком мембранны клетки за счет ГФИЯ. Он относительно подвижен и, видимо, способен спонтанно перемещаться на мембранны соседних клеток, обеспечивая взаимодействие PrP<sup>c</sup> с аномальной изоформой — PrP<sup>d</sup>, т.е. трансмиссию инфекционного агента между нейронами от клетки к клетке. Дисульфидные связи образованы между цистeinами и способствуют образованию характерной пространственной структуры белка. С помощью методов инфракрасной спектроскопии и кругового дихроизма было определено, что вторичная структура PrP<sup>c</sup> содержит 3% β-структур, 43% α-спиралей; остальная ее часть представляет собой гибкий неструктурированный сегмент. За последние годы получены данные трехмерной конформации рекомбинантных PrP<sup>c</sup> мыши, хомяка, человека, а аминокислотная последовательность определена для 26 видов млекопитающих. Установлено, что в мембранных нейронах головного мозга экспрессируется свыше 5000 рецепторных молекул PrP<sup>c</sup> на клетку. В клетках остальных различных тканей, включая лимфоциты крови, их содержание не превышает 3000 молекул на клетку.

## Функции PrP<sup>c</sup>

Прионные болезни в научной литературе называют «мистическими», а присутствие PrP<sup>c</sup> практически во всех тканях у животных и его высокая (95%) степень гомологии среди различных видов млекопитающих позволяют предположить наличие важной физиологической функции PrP<sup>c</sup> в организме. Однако до настоящего времени она остается невыясненной. Трансгенные мыши, у которых отсутствовал ген *PRNP* (мыши PrP<sup>00</sup> или «нок-аут»), были способны к размножению, развивались и чувствовали себя нормально, за исключением изменения циркадных (дормантных) ритмов и электрофизиологических параметров. Они полностью были резистентны к этиологическому агенту ТГЭ (т.е. не проявляли клинических признаков заболевания при интрацеребральном заражении 1000-кратной инфекционной дозой патологической изоформой приона PrP<sup>d</sup>), что неопровергимо доказывало необходимость экспрессии PrP для развития патологического процесса и его трансмиссии. После выявления PrP<sup>c</sup> в синапсах предполагалось участие PrP<sup>c</sup> в регуляции именно нейротрансмиссии. Обсуждалось также, но не подтверждалось, что PrP<sup>c</sup> обладает ферментативной активностью супероксиддисмутазы (СОД) и повышает резистентность клетки к оксидативному стрессу. В настоящее время, основываясь на новых результатах с трансгенными по PrP животными и ранних данных о том, что белок нейронов с м.м. 37 кДа/67 кДа, представляющий рецептор ламинина (белка, играющего важную роль в клеточной адгезии), является одновременно рецептором для PrP<sup>c</sup>, сделан вывод о роли нормального PrP<sup>c</sup> в формировании долгосрочной памяти.

## Патологическая изоформа приона PrP<sup>d</sup>

Аномальная или патологическая форма прионного белка PrP<sup>d</sup> образуется вследствие посттрансляционных конформационных модификаций. Поскольку аминокислотная последовательность различных вариантов PrP<sup>d</sup> полностью идентична нативной PrP<sup>c</sup>, данные изоформы называют конформерами и, в зависимости от вида прионных болезней, обозначают как PrP<sup>SC</sup> (скрепи), PrP<sup>BSE</sup> (ГЭ КРС), PrP<sup>cJD</sup>, PrP<sup>WD</sup>, PrP<sup>RES</sup> или общим термином PrP<sup>d</sup> (от англ. d — disease).

При ТГЭ не увеличивается количество mRNA PrP. Изоформы PrP<sup>c</sup> и PrP<sup>d</sup> имеют молекулярную массу от 33 до 35 кДа, но существенно отличаются пространственной структурой. PrP<sup>d</sup> имеет в своем составе 34%  $\alpha$ -спиралей и 43%  $\beta$ -структур. Основные изменения структуры происходят в области двух первых  $\alpha$ -спиралей. Следует подчеркнуть, что все известные точечные мутации, которые, по-видимому, дестабилизируют структуру белка, локализованы вблизи L-спиралей в пределах глобулярного до-

мена (рис. 3). Такой конформационный переход ведет к изменению физических свойств белка. В отличие от PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>d</sup> нерастворим в детергентах, устойчив к инактивации ионизирующим облучением, ультразвуком и УФ-излучением, подвергается только ограниченному протеолизу протеиназой K (ПК) до протеазо-резистентного фрагмента М.м. 27–30 кД. Ранее в подавляющем числе экспериментов показано, что протеазо-резистентная форма PrP<sup>RES</sup> является неотъемлемым фактором возникновения ГЭ КРС. Экспериментально доказано существование протеазо-чувствительной инфекционной изоформы (PrP<sup>sens</sup>), отличной от PrP<sup>d</sup>. Кроме того, были идентифицированы новые короткие протеазо-резистентные фрагменты м.м. 12–13 кДа, обладающие инфекционностью в биопробе. Новую форму ГЭ КРС, вызываемую протеазо-чувствительной патологической изоформой приона (PrP<sup>sens</sup>) и имеющую сходные клинические признаки с классическим «коровьим бешенством», принято называть атипичной губкообразной энцефалопатией КРС.

PrP<sup>d</sup>, как и PrP<sup>c</sup>, имеет гидрофобный якорь, однако, в отличие от PrP<sup>c</sup>, он свя-



Рис. 3. Схема конформационного перехода (конверсии) нормального клеточного прионного белка PrP<sup>c</sup> в патологическую изоформу PrP<sup>d</sup>. Трансформация третичной структуры характеризуется разрывом дисульфидных связей, уменьшением альфа-спиральных участков белка (НА, НС, НА) и увеличением  $\beta$ -структур «складчатого слоя» (E1, E2, E3

зан с мембраной так, что ГФИЯ не доступен для фосфолипазы. PrP<sup>d</sup> накапливается на поверхности клеток в поздних эндоцитах, лизосомах и в межклеточном пространстве в форме аморфных депозитов, диффузных фибрилл или плотных амилоидных бляшек. Конверсия PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup>, вероятно, происходит на богатых холестерином участках плазматической мембраны.

Согласно белковой гипотезе (protein only theory), конформационный переход является автокатализитическим процессом, в ходе которого необходимо непосредственное физическое взаимодействие PrP<sup>d</sup> с эндогенным PrP<sup>c</sup>, при этом PrP<sup>d</sup> выступает в роли матрицы. Наиболее привлекательна «затравочная модель», которая предполагает существование термодинамического равновесия между двумя изоформами, а внесение экзогенного PrP<sup>d</sup> смешает данное равновесие в сторону накопления PrP<sup>d</sup>. При этом образуется затравка полимерной цепи, состоящей из PrP<sup>d</sup>, к концу которой добавляются мономеры трансформированного PrP. Растущая полимерная цепь может образовывать фрагменты, которые захватываются соседними клетками. Энергетический барьер преодолевается добавлением новых субъединиц. Система становится неравновесной. Эта модель применима и для наследственных ГЭ. Мутации дестабилизируют структуры PrP<sup>c</sup>, что способствует смещению равновесия в сторону образования PrP<sup>d</sup>.

## Видовой барьер

Межвидовая передача ТГЭ всегда характеризуется увеличением инкубационного периода. Степень такой резистентности определяет видовой барьер. Опыты на трансгенных животных и культурах клеток показали, что эффективность формирования PrP<sup>d</sup> зависит от

780

степени гомологии между белками PrP<sup>c</sup> реципиента и донора и соответствия их третичной структуры, что доказывает необходимость прямого взаимодействия между PrP<sup>c</sup> и PrP<sup>d</sup>. Минорные различия даже в пределах нескольких а.к. в центральной части молекулы PrP<sup>c</sup> (109 а.к. по 190 а.к.) ведут к возникновению резистентности при межвидовой передаче ТГЭ. Замены одной аминокислоты влияют на чувствительность к ТГЭ. Полиморфизм в кодоне 129 у человека повышает или понижает его чувствительность к БКЯ. Аналогичные данные по полиморфизму генов *PRNP* и устойчивости к скрепи и ХИБ получены для овец и оленей соответственно.

## Штаммы прионов

Главной проблемой белковой теории, постулирующей, что конверсия PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup> происходит без участия нуклеиновой кислоты, является существование так называемых «штаммов» PrP<sup>d</sup>. Штаммы PrP<sup>d</sup> отличаются биологическими свойствами: инкубационным периодом, клиникой болезни, распределением PrP<sup>d</sup> в мозговой ткани и в органах за пределами ЦНС. Они могут быть по-разному гликозилированы и по-разному подвергаться нарезанию ПК. Штаммы PrP<sup>d</sup> были зафиксированы у животных с одним и тем же генотипом. По белковой теории их дифференцировка должна определяться стабильным различием в трехмерной структуре PrP<sup>d</sup>, а не мутациями в специфической нуклеиновой кислоте. Большинство полученных к настоящему времени данных приводят к заключению, что трехмерная структура является основой штаммовых различий и передача штаммо-специфического фенотипа происходит посредством негенетического механизма, что пред-

ставляет абсолютно новое явление в генетике. Однако нельзя исключить участие в этом процессе дополнительных кофакторов белковой природы, таких как шапероны и др.

## Патогенез ТГЭ

Эпизоотия ГЭ КРС в Англии в середине 1990-х годов и передача этого заболевания другим видам, а затем возникновение среди людей нового варианта БКЯ инициировали исследования, направленные на выяснение того, каким образом прионы попадают в ЦНС после периферического (орального, внутрибрюшинного) заражения. Напомним, что одной из главных характеристик прионных заболеваний является длинный инкубационный период. Он, видимо, нужен для репликации и накопления прионов в резервуаре, к которому относят лимфоретикулярную систему (ЛРС). Многочисленные исследования указывают на репликацию прионов в лимфатических органах, предшествующую репликации в ЦНС даже при внутримозговом заражении. Инфекционность при этом аккумулировалась во всех компонентах ЛРС, включая лимфатические узлы и пейкеровы бляшки в тонком кишечнике. В случае нвБКЯ прионы концентрировались в лимфоидной ткани миндалин. Другой возможный резервуар — симпатическая нервная система (СНС). Например,  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  был обнаружен в брюшных ганглиях после орального заражения лабораторных животных. В настоящее время патологические изоформы прионов выявлены практически во всех тканях и органах организма человека и животных, а также в ряде биологических жидкостей (моча, слюна, спинномозговая жидкость, кровь и др.).

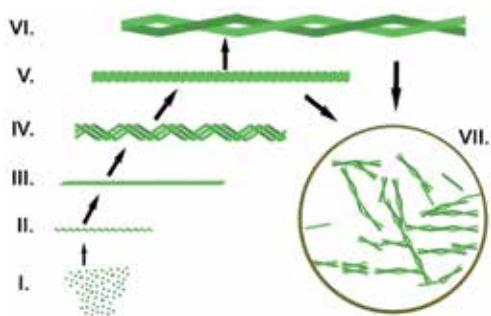


Рис. 4. Схема образования амилоидо-подобных агрегатов (фибрилл) рекомбинантным прионным белком

Следует подчеркнуть, что, несмотря на все чрезвычайные усилия международного научного сообщества, детальные механизмы возникновения патологической изоформы приона, накопления и межвидовой трансмиссии инфекционных вариантов остаются неизвестными. Так, один из непостижимых феноменов проявления патогенеза прионов заключается в следующем. Как отмечалось выше, все клетки тканей и крови, кроме моноцитов, в среднем насчитывают до 3000 рецепторных молекул  $\text{PrP}^{\text{c}}$  на клетку, а нейроны головного мозга имеют лишь немного больше — до 5000 молекул  $\text{PrP}^{\text{c}}$  на клетку. Если локализованные в мемbrane нейроны мозга  $\text{PrP}^{\text{c}}$  служат «воротами инфекции», т.е. матрицей, на которой происходит преобразование прионов в инфекционную изоформу и ее амплификация после взаимодействия с экзогенными молекулами  $\text{PrP}^{\text{d}}$ , т.е. инфекционной «затравкой», то почему данный процесс не проявляется в других тканях на всем гипотетическом пути движения исходной патогенной формы приона при периферическом заражении (оральном, внутрибрюшинном)? Почему вакуолизации и «губкообразной» гибели подвергаются только нейроны головного мозга, а не клетки эпителия желудка, тонкой кишки, В- и Т-лимфоциты крови, фолликуло-дendритные клетки и,

наконец, нейроны парасимпатической системы, располагающие лишь незначительно меньшим количеством идентичных «реципиентных» молекул PrP<sup>c</sup>? Эти проблемы вызывают неослабевающий интерес к развитию новых подходов и методов изучения уникального белкового возбудителя прионных болезней человека и животных, в том числе для создания средств профилактики и терапии прионных болезней.

Патогенная изоформа PrP<sup>d</sup> более гидрофобна, более устойчива к протеиназам, способна собираться в надмолекулярные комплексы — «скрепи-ассоциированные фибриллы» и, самое важное, способна при контакте с нормальным клеточным прионным белком вызывать его пространственную изомеризацию, результатом которой является превращение молекулы нормального прионного белка в патогенную изоформу. Процесс изомеризации протекает без участия каких-либо других факторов. По этой причине поиск средств профилактики и лечения прионных болезней до настоящего времени не дал существенных результатов. В настоящее время не найдены какие-либо фармакологические средства, способные в организме животного и человека прижизненно блокировать процесс сборки скрепи-ассоциированных фибрилл. Конформационная модификация PrP<sup>c</sup> с образованием аномальной, инфекционной формы PrP<sup>d</sup>, является молекулярной основой прионных болезней.

## Диагностика ТГЭ

С момента открытия прионных болезней был разработан ряд методов для их диагностики, большинство из которых в практических условиях рассчитаны на посмертное исследование тканей головного или спинного мозга для выявления PrP<sup>d</sup> с помощью гисто-

логического, иммуногистохимического (ИГХ), иммуноферментного (ИФА), иммунохроматографического (ИХМ) методов и иммуноблоттинга (ИБ). При этом лишь немногие системы диагностики ТГЭ достигли уровня коммерческих продуктов (Enfer, Bio-Rad, Prionics, IDEXX). В нашей стране в диагностику скрепи овец и ГЭ КРС большой вклад внесли ученые и специалисты ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко и ФГБУ «ВНИИЗЖ» [5, 9, 10, 11, 12]. Позднее, в 2004–2012 гг., в рамках выполнения международного проекта коллектив ученых из НПО «НАРВАК», НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ГНУ ВНИИВВиМ и ФГБУ «ВНИИЗЖ» при участии коллег из Республики Беларусь выполнил ряд исследований по разработке и совершенствованию диагностических исследований на ТГЭ [1, 2, 3, 4, 8]. В настоящее время ОIE рекомендует следующие методы для диагностики ГЭ КРС (табл. 2).

## Гистопатологический метод

Гистологическое исследование ткани головного мозга погибшего человека или животного является одним из первых отработанных методов диагностики ТГЭ. Характерной картиной при ТГЭ является присутствие на гистологических срезах ткани многочисленных вакуолей различного размера (рис. 5). Ткань напоминает губку. Отсюда название болезней — губкообразные энцефалопатии. Однако такое изменение ткани мозга может наблюдаться при других патологиях или быть следствием неправильной подготовки образца. Другим типичным признаком ТГЭ является пролиферация астроцитов (астроцитоз), наличие амилоидных бляшек и гибель нейронов [21].

Таблица 2. Методы диагностики ГЭ КРС согласно рекомендациям ОIE [45]

Метод	Цель исследования					
	Подтверждение отсутствия инфекции в популяции	Подтверждение отсутствия инфекции у животного перед транспортировкой	Оценка эффективности оздоровительных мероприятий	Подтверждение положительных случаев	Проведение эпизоотологического мониторинга инфекции	Оценка иммунного статуса животного или популяции после вакцинации
Идентификация возбудителя <sup>1</sup>						
ИГХ	н/п	н/п	++ <sup>3</sup>	+++	++	н/п
ИБ	н/п	н/п	++	+++	++	н/п
Быстрые скринирующие тесты <sup>2</sup>	н/п	н/п	+++	+	+++	н/п
Гистопатологический метод	н/п	н/п	+	+	+	н/п

*Примечание:*

+++ рекомендованный валидированный метод;

++ подходящий, но не валидированный — рекомендованный метод;

++ — подходящий метод;

+ — метод может применяться в некоторых случаях, однако стоимость и другие факторы ограничивают применение;

н/п — метод не применяется.

<sup>1</sup> в некоторых клинических случаях рекомендована комбинация методов идентификации возбудителя;

<sup>2</sup> быстрый ИБ, ИХМ и ИФА;

<sup>3</sup> не все методы категорий +++ и ++ имеют формальную валидацию, однако они много лет повсеместно используются в рутинной диагностике, не дают сомнительных результатов и поэтому являются приемлемыми для указанных целей.

Изучение гистологических препаратов позволяет идентифицировать морфологические изменения, связанные собственно с «губкообразностью» дегене-

ративных повреждений ткани мозга на конечных стадиях заболевания. Метод выявляет вакуолизацию нейронов, деградацию клеток глии и астроцитов. Од-

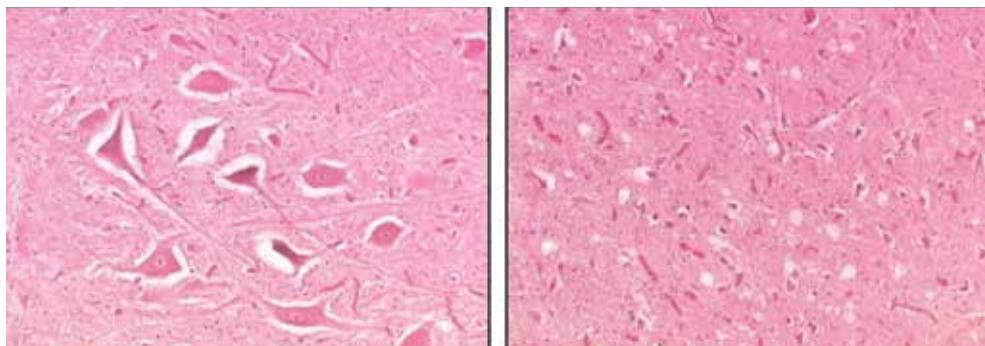


Рис. 5. Гистологические изменения в головном мозге при ГЭ КРС. Дегенерация нейронов головного мозга (слева); вакуолизация тканей головного мозга (справа)

нако выявляемые гистологически картины нарушений сильно различаются по интенсивности и анатомической локализации как среди видов животных, так и среди отдельных их представителей [42].

## **Иммуногистохимический метод (ИГХ)**

Иммуногистохимическое определение PrP<sup>d</sup> на срезах тканей стало повсеместным обязательным подтверждающим тестом ГЭ КРС. В США ИГХ является «золотым стандартом» для подтверждающей диагностики скрепи овец, являющимся обязательным после проведения ИФА с образцами мозга или биопсийного материала третьего века и/или тканей эпителия прямой кишки овец [29, 30].

Существенным затруднением при иммунохимическом выявлении инфекционной изоформы прионного белка является специфическое связывание антител к PrP как с нормальной клеточной, так и с патогенной конформациями. Несмотря на появляющиеся заявления о получении моноклональных антител (МАТ), специфичных только PrP<sup>d</sup> изоформе белка, применение в практической диагностике ТГЭ они до сих пор не нашли. Таким образом, все имеющиеся в настоящее время тест-системы для выявления аномальной формы PrP включают в себя стадию избирательной элиминации PrP<sup>c</sup>. Клеточный прионный белок чувствителен к формалиновой фиксации, деградирует при подготовке образцов и не выявляется при ИГХ, а epitопы аномальной формы PrP<sup>d</sup> в этих же образцах демаскируются при обработке муравьиной кислотой, протеолитическими ферментами и нагревании. Данный феномен элиминации иммунореактивности нормального белка и увеличения уровня детекции PrP<sup>d</sup> используется при мониторинге ТГЭ-инфицированных животных

в сравнительном анализе со здоровыми особями. Кроме того, ИГХ позволяет наблюдать накопление патогенных прионов в конкретных клетках и тканях.

ИГХ-анализ проводится на срезах ткани, фиксированной в формалине и заключенной в парафин. Срезы обрабатывают муравьиной кислотой, ПК и подвергают в ряде случаев гидролитическому автоклавированию. Затем, используя специфические МАТ, осуществляют иммунную реакцию на срезах. Окрашивание достигается применением вторичных видоспецифических меченых антител.

Отечественными учеными была получена панель МАТ, два из которых имеют активность, достаточную для специфического окрашивания ПК-резистентных скоплений прионных белков, и могут быть использованы для посмертной диагностики ТГЭ животных и человека методами ИГХ и ИБ (рис. 6, 7) [6].

В 2007 г. был описан новый метод детекции PrP<sup>c</sup> в срезах ткани мозга, основанный на использовании полимеров, содержащих в своем составе гетероциклическое соединение — тиофен. Специфическое нековалентное связывание таких полимеров с PrPsc изменяет их спектральные свойства в конформационно-зависимой манере, поэтому их применение в ИГХ позволяет дифференцировать штаммы ТГЭ, т.е. тонкие различия в пространственной структуре PrP<sup>c</sup>. Таким образом, удалось найти отличия ГЭ КРС от нового штамма ТГЭ — амилоидной губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота [37].

## **Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноблоттинг (ИБ)**

Эпизоотия ТГЭ среди крупного рогатого скота, разразившаяся в 1996 г. в Англии, и последовавшие за ней

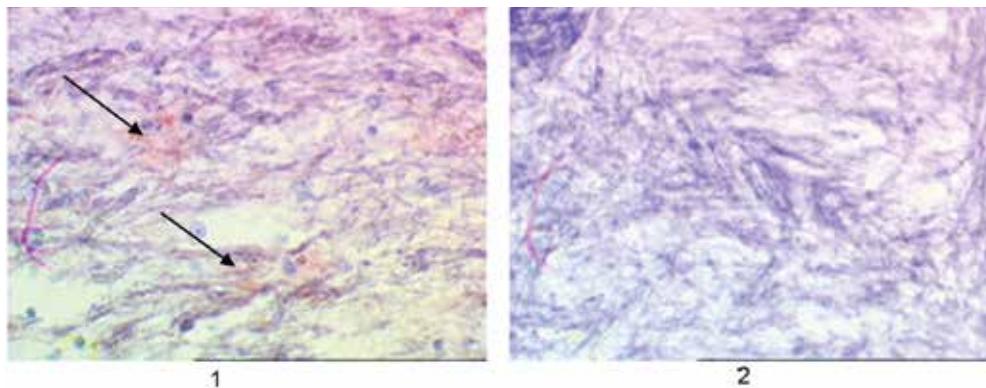


Рис. 6. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов тканей головного мозга (обекс) крупного рогатого скота, позитивного (1) и негативного (2) в отношении губкообразной энцефалопатии, с использованием МАТ 2с8. Увеличение  $\times 625$ . Коричневые области на фотографии слева демонстрируют области наибольшего накопления ПК-резистентного  $\text{PrP}^d$

случаи нвБКЯ среди людей инициировали исследования в области разработки простых, быстрых и чувствительных методов диагностики ТГЭ, а также работы по получению антител к прионному белку. ЕС принял жесткие меры по предотвращению попадания контаминированной продукции в пищевую цепь, обязав проводить мониторинг ТГЭ на скотобойнях и мясокомбинатах. Диагностика прионных заболеваний базировалась на анализе образцов с помощью ИФА и ИБ, которые определяли наличие в исследуемом материале  $\text{PrP}^d$ , являющимся маркером ТГЭ.

В настоящее время МАТ и лигандов, надежно различающих  $\text{PrP}^d$  и  $\text{PrP}^c$  в их нативной форме, не получено. По этой причине дифференцировка патологической  $\text{PrP}^d$  и нормальной  $\text{PrP}^c$  конформаций белка основана на различии их биохимических свойств. Большинство тест-систем используют устойчивость  $\text{PrP}^d$  к обработке ПК по сравнению с  $\text{PrP}^c$ . Необходимыми этапами во всех коммерческих тест-системах является экстракция  $\text{PrP}^c$  или  $\text{PrP}^d$ , их денатура-

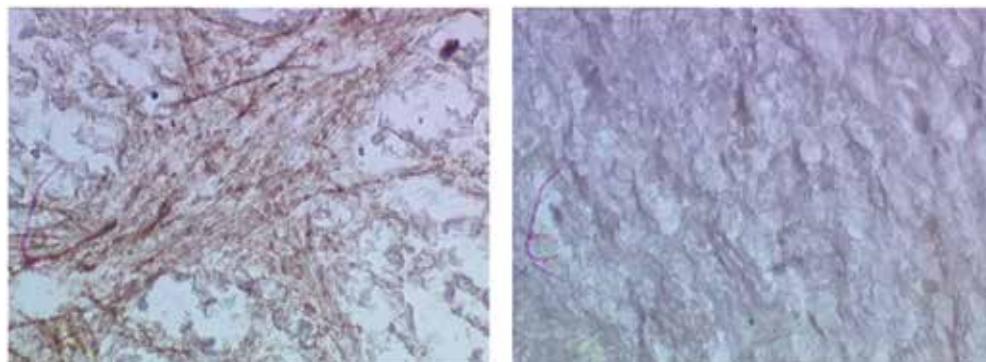


Рис. 7. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов тканей головного мозга (обекс) благородного оленя, положительного (слева) и негативного (справа) в отношении ХИБ, с использованием МАТ 2с8

ция для обеспечения лучшего доступа антителам к эпитопам белка, а также обработка исходных образцов ПК для гидролиза PrP<sup>c</sup>.

В ИФА используют широкий спектр МАТ. PrP<sup>d</sup> захватывается антителами к PrP или специфическими лигандами, иммобилизованными на плашках, затем для обнаружения PrP<sup>d</sup> применяют детектирующие системы различного формата [20].

Анализ материала с помощью ИБ осуществляется по стандартной схеме: денатурация, анализ в полиакриламидном геле, перенос на мембрану, детекция PrP<sup>d</sup> с помощью антител [40].

Помимо вышеперечисленных лабораторных методов, направленных на выявление PrP<sup>d</sup> в биологическом материале, существует самый старый метод диагностики ТГЭ — биопроба на экспериментальных животных, являющийся специфическим и чувствительным методом. При ее постановке в качестве объекта заражения обычно берут мелких грызунов — мышей, хомяков. Часто для этих целей используют рыжую европейскую полёвку (*Clethrionomys glareolus*, *Myodes glareolus*), имеющую более короткий инкубационный период (несколько месяцев) по сравнению с другими млекопитающими [14].

Заражение животного осуществляют, как правило, путем внутричерепной инъекции гомогенатом потенциально инфицированной ткани. Развитие болезни подтверждают с помощью гистологии, ИГХ и ИБ. Эффективность метода биопробы существенно повысилась с появлением трансгенных мышей. Путем генно-инженерных манипуляций у трансгенных животных ген прионного белка может быть заменен на *PRNP* другого животного (человека, крупного рогатого скота и т.д.), а также увеличена экспрессия белка PrP<sup>c</sup>, что позволяет сократить инкубационный

период и преодолеть видовой барьер [17, 19, 28].

## Проблемы прижизненной диагностики ТГЭ

Впервые прижизненный (преклинический) тест для выявления патогенного прионного белка скрепи в периферической лимфоидной ткани был разработан на основе ИГХ Katherine O'Rourke с коллегами [29, 30]. Этот уникальный тест позволяет выявлять PrP<sup>d</sup> в так называемом «третьем веке» — лимфоидном органе инфицированной овцы — за месяцы или годы до появления первых клинических признаков болезни. Внедрение данного метода позволило осуществлять мониторинг скрепи среди поголовья живых овец и отбирать клинически здоровых взрослых особей для племенных целей. Этими же авторами генотипированием *PRNP* были выделены группы риска для скрепи, что также было использовано для селекции устойчивой к скрепи популяции животных (овец и коз) [38, 39].

В настоящее время подтверждена возможность детекции PrP<sup>d</sup> в лимфоидных узлах, пейкеровых бляшках, гландах, аппендиксе, третьем веке, что позволяет в ряде случаев выявить болезнь на преклинической фазе у животных и человека [13, 23]. Необходимо подчеркнуть, что успех применения ИГХ-анализа в значительной степени зависит от качества подготовки исследуемого материала и используемых антител. В последние годы появляются варианты методов фактически прижизненной диагностики, столь необходимые для человека в первую очередь. Среди большого количества прототипов таких тест-систем следует выделить два наиболее перспективных.

Разработанный в 2001 году метод цитохимической амплификации патогенной изоформы приона PrP<sup>d</sup> с помощью мо-

номеров рекомбинантных PrP<sup>c</sup> белков путем конверсии последних в аномальную изоформу *in vitro* [35]. Метод и его модификации получил название «метод белковой конверсии» (Protein misfolding assay, PMA, Protein misfolding cyclic amplification, PMCA и др.) Метод основан на схожем с методом ПЦР принципе: если в образце даже в ничтожно малых количествах присутствует PrP<sup>d</sup>, то при добавлении в образец PrP<sup>c</sup> происходит конверсия PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup>. Агрегаты PrP<sup>d</sup> подвергают фрагментации/соникации, и образовавшиеся в результате этого фрагменты PrP<sup>d</sup> в свою очередь служат «матрицей» для конверсии PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup>. Таким образом, в результате циклической амплификации количество PrP<sup>d</sup> в образце многократно возрастает. Этот метод применим для обнаружения PrP<sup>d</sup> не только в тканях мозга, но и в крови [34]. Однако необходимо учитывать, что возможно и спонтанное образование PrP<sup>d</sup> в ходе PMCA анализа, что приведет к ложноположительному результату.

Метод амплификации аминокислотных последовательностей с использованием индуцированной вибрацией конверсии PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup> (индуцированная вибрацией конверсия, ИВК, quaking-induced conversion, QuIC) [15], а также его модификация — ИВК в режиме «реального времени» (quaking-induced conversion real time, QuIC-RT, ИВК-РВ) — один из наиболее перспективных в настоящее время подходов к обнаружению PrP<sup>d</sup> и наиболее подходящий метод для использования в повсеместной клинической практике, позволяющий обнаруживать PrP<sup>d</sup> начиная с 1 фг [16].

## Атипичные формы ГЭ КРС и ТГЭ человека

Исследования детальных особенностей ГЭ КРС привели к обнаружению

особых, так называемых атипичных форм данного заболевания. В 2004 году во Франции были обнаружены изоформы варианта ГЭ КРС, полипептиды PrP<sup>d</sup> которого после стандартной обработки ПК имели иные характеристики в ИБ. Эти изоформы были отнесены к новому типу — L- и H-формам так называемой атипичной ГЭ КРС. Однако выделялся данный штамм исключительно из очень старых животных и представлял экзотический вариант прионного патогена на фоне тотального мониторинга коров не старше 2-летнего возраста. В короткие сроки ведущими фирмами IDEXX и Prionics были созданы быстрые тест-системы на основе ИХМ (IDEXX Herd Check BSE-scrapie short protocol), способные эффективно выявлять новый штамм ГЭ КРС. Дальнейшие опыты по экспериментальному заражению обезьян и высших приматов данными штаммами А-ГЭ КРС снизили обеспокоенность по поводу патогенности новых прионных изоформ для человека [27, 41].

В 1990 г. в Великобритании, а с 1993 г. в странах ЕС начались исследования по надзору возможной трансмиссии ГЭ КРС в человеческую популяцию.

В 1995 году было установлено значительное число случаев БКЯ с клинико-патологическим фенотипом, отличающимся от всех предыдущих вариантов прионных болезней человека. В 1996 году объединенная комиссия ЕС выявила 10 случаев БКЯ у молодых людей, причем время наступления летального исхода у них происходило при среднем возрасте 29 лет, в отличие от больных спорадической формой сБКЯ, у которых смерть наступала при среднем возрасте 66 лет. Кроме того, при этом варианте БКЯ наблюдалась необычная, удивительно единообразная картина клинической манифестации. Во всех случаях данного варианта наблюдались психиатрические симптомы, депрессия, предшест-

вующая появлению неврологических признаков. Терминальная стадия новой болезни была аналогична классической БКЯ. Нейропатологические проявления, включающие характерное флоридное («цветистое») формирование амилоидных бляшек в мозге, отличались от всех наблюдавшихся вариантов БКЯ в прошлом. В 2003 г. аналогичные случаи были зафиксированы во Франции, Ирландии, Италии, США и Канаде. Болезнь получила название новый вариант БКЯ (нвБКЯ, vCJD, nvCJD).

В настоящее время принято считать, что, в отличие от спорадической формы, болезнь не имеет четкого возраста заражения. У пациентов с нвБКЯ часто выявляют и психиатрические симптомы, потому порой она ошибочно диагностируется как психическое, а не неврологическое расстройство. Истинная причина психиатрических симптомов кроется в когнитивных нарушениях, постоянных болях в конечностях, нарушениях адекватности ощущений (парестезия или дизестезия), расстройствах речи или зрения. В течение 6–8 месяцев развиваются пороки управления мышечной системой, но в некоторых случаях развитие болезни может длиться и более 18 месяцев, потому диагноз достаточно трудно поставить при появлении первых признаков заболевания. Если у пациента возникают неконтролируемые движения, возрастает вероятность грамотного диагностирования нвБКЯ. В отличие от спорадической формы, где характерны внезапные мышечные спазмы при напряжении (миоклонус), в случае с новой формой возможны и дистония (синдром, при котором происходит постоянное спазматическое сокращение мышц), и хорея (синдром, характеризующийся беспорядочными, отрывистыми, нерегулярными движениями). Летальная стадия новой формы похожа на летальную стадию спорадической формы болезни Крейтцфельдта—

Якоба, она проходит с прогрессирующей потерей контроля над мышцами, часто приводящей к состоянию акинетического мутизма. Анализ факторов риска в случаях инфицирования людей с нвБКЯ показал, что ни один из них не был обусловлен нейрохирургическим вмешательством, использованием при терапии гормонов человеческого происхождения. Полное секвенирование гена PrP (*PRNP*) у больных нвБКЯ не выявило никаких мутаций, провоцировавших процессы развития прионной болезни у людей.

Но во всех исследованных случаях пациенты с нвБКЯ употребляли мясные продукты, в том числе экспортированные из неблагополучных по ГЭ КРС регионов. Таким образом, совокупность полученных данных указывала на алиментарный путь заражения у людей, который в дальнейшем становился основным при развитии доказательной базы на основе последующих молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических исследований.

Эпидемиологическое подтверждение данного пути трансмиссии ГЭ КРС человеку было продемонстрировано при экспериментальном заражении алиментарным путем лабораторных животных, включая малых обезьян и высших приматов. Нейропатологические характеристики у опытных животных, инокулированных агентами ГЭ КРС, и профили белковых депозитов скоплений в мозге инфицированных лабораторных животных были идентичны таковым при ГЭ КРС. Кроме того, опыты по трансмиссии ГЭ КРС мышам выявили те же инкубационные периоды, как и при развитии ГЭ КРС, а также идентичное распределение амилоидных продуктов в тканях мозга. В дальнейших опытах по трансмиссии ГЭ КРС и исследованиях симптомов прионных заболеваний у животных была обнаружена передача агента ГЭ КРС двум семействам: (*Bovidae*, по-

лорогие: антилопы, козы, олени и *Feline*, кошачьи).

Обеспокоенность специалистов и широкой общественности возрастала по мере расширения ареала ГЭ КРС. Беспокойство населения особенно возросло после появления нового варианта болезни Крейтцфельдта–Якоба (нвБКЯ). Считается доказанным, что возбудитель ГЭ КРС опасен для человека. И в настоящее время имеются эпидемиологические, эпизоотологические, клинические и молекулярно-биологические доказательства связи ГЭ КРС и нвБКЯ. С целью защиты здоровья людей Европейской комиссией еще в 2001 году было принято решение об удалении «материалов специфичного риска» ГЭ КРС: дистального отдела тонкого кишечника с брыжейкой и миндалин у КРС всех возрастов, черепа, включая головной мозг и глаза, спинного мозга КРС от 12 месяцев и позвоночника КРС возрастом от 30 месяцев. С целью содействия продаже говядины на внутреннем рынке ЕС и экспорту было начато тестирование головного мозга всего КРС в возрасте 30 месяцев и старше, убитого в странах ЕС для потребления человеком.

## Хроническая изнуряющая болезнь диких копытных (ХИБ)

Хроническая изнуряющая болезнь (CWD, ХИБ) — это прогрессирующее, 100% летальное заболевание нервной системы, инфекционный агент которого естественным образом заражает белохвостых оленей, оленей-мулов, лосей и северных оленей. ХИБ относится к семейству заболеваний, известных как трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (ТГЭ, TSE), или прионные заболевания. Хотя он имеет общие черты с другими ГЭ, такими как губкообразная энцефалопатия крупного рогатого

скота ГЭ КРС (BSE) и скрепи у овец, это отдельное заболевание, о котором известно только, что оно естественным образом поражает животных семейства оленей (*Cervid*). В настоящее время нет прямых научных доказательств того, что ХИБ может передаваться людям. Различные варианты экспериментального заражения высших приматов возбудителем ХИБ не приводили к проявлениям и развитию летальной инфекции типа нвБКЯ, сравнимой по срокам с инфекционностью ГЭ КРС. Однако в качестве меры предосторожности надзорными органами рекомендуется, чтобы любая ткань, которая может быть получена от известного ХИБ-инфицированного животного, не использовалась и не потреблялась людьми.

Кроме того, описаны случаи одновременного заражения одногодичных близнецов, охотников США, употреблявших постоянно полусырую и копченую оленину, умерших практически в одни сроки с диагнозом нвБКЯ и выявленной посмертно изоформы ГЭ КРС в образцах мозга. Следует также отметить, что в 18 штатах США ежегодно надзорные ветеринарные службы сжигают до 40 000 оленевых туш в режиме строгого контроля.

Особое внимание вызывает статья Barria M.A. et al. (2018). Авторам удалось *in vitro* методом РМСА конвертировать нормальный прионный белок человека в его патогенную изоформу, используя прионы оленей, пораженных ХИБ, как матрицу при амплификации [18].

## Клинические признаки ХИБ

Животные с ХИБ могут проявлять ряд различных клинических признаков, поскольку болезнь медленно повреждает их мозг. Они могут включать в себя депрессию, затруднение гло-

тания, избыточное слюноотделение, усиление жажды, несогласованность движений, паралич, пневмонию, отделение от других животных в стаде, необычное поведение (вертячка), чрезмерное мочеиспускание и потерю веса до 20% от нормального. Признаки могут наблюдаться в течение от нескольких недель до месяцев, прежде чем животное умрет, однако некоторые инфицированные животные могут не проявлять клинических признаков. Клинические признаки, как правило, проявляются у животных, от трех до четырех лет, но могут наблюдаться и у животных в возрасте от 15 месяцев и до 13 лет. Впервые ХИБ, или «синдром истощения», был выявлен в исследовательском центре в Колорадо в 1967 году. К 2019 г. ХИБ была обнаружена как в неволе, так и у диких оленей и лосей в Северной Америке, Республике Корея, Норвегии, Швеции и Финляндии. Существуют как прямая (от животного к животному), так и непрямая передача через окружающую среду (от животного через корм к животному). Считается, что передача происходит через выделение инфекционного агента в слюне, молоке и кале. Инкубационный период обычно длится от 16 до 36 месяцев.

Диагноз на ХИБ предварительно устанавливают на основании клинических признаков, однако необходимо лабораторное подтверждение путем тестирования ткани миндалин или мозга от пораженного животного после его смерти [38, 39]. Отрицательный результат теста не гарантирует, что отдельное животное не инфицировано ХИБ (концентрация агента ХИБ у инфицированных животных в ткани мозга и лимфатических узлов варьирует в широких пределах, в этом существенное отличие от ГЭ КРС или скрепи овец и коз), но значительно снижает вероятность его возникновения и может снизить риск контакта с ХИБ,

например при контакте с тканями этого животного.

Лечение ХИБ, как и прочих прионных болезней, отсутствует. Неблагополучие по ХИБ оленей было зафиксировано до 2019 г. включительно в 6 странах: Северной Америке (Канада, США), Скандинавии (Норвегия, Финляндия, Швеция) и на территории Южной Кореи.

Программа федерального уровня в США по контролю ХИБ, включающая надзор, диагностику болезни, исследования и противоэпизоотические меры, была принята в июне 2002 г. Количество оленей и лосей в США по состоянию на начало 2000-х превышало 22 миллиона в сумме свободно обитающих и содержащихся на фермах. Программа активного наблюдения (126 000 тестов в год) показала превалентность заболевания в неблагополучных регионах около 5%. CWD является «регистрируемой болезнью» в соответствии с Законом о здоровье животных. Это означает, что обо всех подозрительных случаях необходимо немедленно сообщать в CFIA (Агентство по безопасности продовольствия Канады) и в аналогичное в США. Наиболее подверженные виды — олени Скалистых гор (*Cervus elaphus nelsoni*), олень-мул (*Odocoileus hemionis*), белохвостый олень (*Odocoileus virginianus*), лось (*Alces alces*). Основной путь распространения болезни — контаминация пастбищ и корма на фермах инфекционным агентом ХИБ, содержащимся в слюне инфицированных животных. Гиперсаливация, снижение на 20% массы животных и атаксия — основные клинические признаки ХИБ. В настоящее время интенсивность исследований ХИБ в мире резко возросла. При этом используются новейшие тест-системы, в том числе для доклинической диагностики, с использованием метода ИВК-РВ [24]. При этом методе используют образцы мочи, слюны и назальных смызов у жи-

вотных, т.е. практически апробируются прототипы тест-систем для прижизненной диагностики прионов.

В 2018 г. в результате выполнения первого этапа трехлетней программы эпизоотологического надзора за ХИБ в Эстонии, Финляндии, Латвии, Литве, Польше и Швеции было проведено тестирование 5110 оленей и лосей и подтверждены случаи ХИБ у диких лосей в Финляндии (т.е. на границе с Россией). В предыдущие годы в Российскую Федерацию неоднократно завозили преимущественно белохвостых оленей из США и Канады. Имеются сообщения о выявлении оленей с нейропатологическими признаками среди ввезенных животных. Мониторинг ХИБ не предписан ОIE, однако существует задача обеспечения благополучия популяций оленей и лосей, в том числе крупнейшей популяции северного оленя (согласно результатам научных исследований, северный олень чувствителен к инфекционному агенту ХИБ).

## **Современное состояние проблемы ГЭ КРС в РФ и в мире**

Осуществление мер по искоренению ГЭ КРС в мире за последние 20 лет принесло реальные позитивные результаты и привело к сокращению количества обязательных анализов. В развитых странах ЕС мониторинг сократился до нескольких тысяч тестов в год. Так, в Германии он составил 1500 анализов, в Польше в 2018 году — не более 20 проб и т.п. До настоящего времени обязательный мониторинг продолжается в отдельных странах Южной Европы. «Последний» случай выявления во Франции зафиксирован в 2016 году и аналогичный «последний» случай ГЭ КРС зафиксирован в Шотландии в 2018 году.

В Российской Федерации на базе референтной лаборатории ГЭ КРС (в настоящее время — референтной лаборатории бешенства и ГЭ КРС) ФГБУ «ВНИИЗЖ» за прошедшие десятилетия объем исследований возрасстал от 500–1000 обязательных проб в год (согласно установленной выборке, в зависимости от поголовья КРС страны) до 20 000 анализов в 2018 г. и 23 000 анализов в 2019 г. соответственно. При этом, благодаря оперативно выработанным карантинным мерам МСХ РФ, не было выявлено достоверно установленных случаев ГЭ КРС на территории нашей страны.

В настоящее время в профильном комитете ОIE рассматривается вопрос о прекращении планового мониторинга ГЭ КРС в ближайшие годы.

Вместе с тем случаи выявления нвБ-КЯ — прионной инфекции людей, связанной с потреблением мясопродуктов от инфицированных ГЭ КРС животных, продолжаются.

Возникновение эпизоотии ГЭ КРС привело к снижению сбыта продукции животноводства, прежде всего мяса КРС, а также многих видов продукции, в производстве которых применяют биоматериалы КРС, и очень большим экономическим потерям, поэтому важно не допустить возникновения этой болезни в популяции отечественного КРС.

В 2001 году с публикацией Регламента ЕС № 999/2001 Европейского парламента и Совета от 22 мая 2001 г., вводящего в действие правила предотвращения, контроля и эрадикации некоторых трансмиссивных губкообразных энцефалопатий, в 15 странах Европейского союза (ЕС15), в максимальной степени пострадавших от эпизоотии ГЭ КРС, были приняты современная система мониторинга факторов риска этой болезни и правила защиты здоровья людей и жи-

вотных от заражения агентом губкообразной энцефалопатии [10]. Главная цель разработки вышеназванного Регламента — проведение максимально эффективных мер, направленных на эрадикацию ГЭ КРС и скрепи овец и коз, а после введения в действие Постановления Европейской комиссии № 2017/1972 от 30.10.2017 г. — и хронической изнуряющей болезни оленей и лосей.

Разработке Регламента № 999/2001 предшествовал ряд событий, которые превратили ГЭ КРС из проблемы преимущественно ветеринаров и животноводов в проблему общественного здравоохранения, финансовой стабильности животноводческой отрасли, государственных бюджетов, занятости населения, внутренней и международной торговли продукцией животноводства и другими видами продукции, в производстве которых применяют биоматериалы жвачных сельскохозяйственных животных.

В конце 1990-х в странах Западной Европы, а с 2004 г. — и в «новых» странах Европейского союза были введены в действие эффективные противоэпизоотические меры против ГЭ КРС, основанные на запрете применения в корм продуктивным сельскохозяйственным животным кормов, содержащих белок теплокровных животных, а также эффективная система мониторинга ГЭ КРС, целевыми группами которой были как животные группы риска ГЭ КРС, так и здоровые животные, направленные на мясокомбинаты для производства продукции. Однако эффективность мониторинга ГЭ КРС среди здорового крупного рогатого скота всегда была невысокой. В 2001 г. количество выявленных случаев ГЭ КРС среди групп риска составляло около 1000 на миллион исследований, а среди здорового КРС — около 37 на миллион исследований [13].

Начиная с 2002 г. в результате принятых мер количество выявляемых случаев ГЭ КРС стало последовательно снижаться приблизительно в 1,5–2 раза ежегодно, и в последние 8 лет эпизоотический вариант ГЭ КРС является редкой болезнью с явной тенденцией к ликвидации.

Исследования здорового КРС, направленного на мясокомбинаты, проводят в относительно небольшом количестве в некоторых странах ЕС, однако такие исследования являются одним из условий контрактов на экспорт продукции животноводства и не предписаны ветеринарным законодательством Европейского союза.

Исследования на ГЭ КРС среди здоровых животных никогда не были предписаны как обязательные со стороны ОIE, и такие исследования в странах Европейского союза имели преимущественно коммерческое обоснование, как дополнительное и, в некоторой части, избыточное условие для содействия сбыту продукции животноводства. В странах, неблагополучных по ГЭ КРС, безопасность продукции обеспечивают удалением материалов специфичного риска и их уничтожением.

В настоящее время существует два основных мнения о потенциальной угрозе дальнейшего географического распространения ГЭ КРС и возможности полного искоренения данной болезни, основанные на противоречивых научных данных последних лет. С одной стороны, статистические анализы ЕС и ОIE указывают на выявление лишь отдельных и относительно редких случаев заболевания в странах, где болезнь изначально была выявлена (Великобритания, Ирландия и др.), после введения международных правил и мер по контролю, мониторингу и надзору ГЭ КРС. Эти данные обнадеживают снижением рисков ГЭ КРС в мире и предполагают возможное иско-

ренение заболевания в скором будущем. С другой стороны, имеются сообщения о новых случаях ГЭ у животных, рожденных в странах, где жесткий запрет на рециркуляцию субпродуктов мясного происхождения был давно введен. Недавно было доложено о новых случаях ГЭ КРС в странах Восточной Европы, а также о новом «штамме», виде возбудителя ГЭ КРС в ряде стран Европы и США. Исходя из этих наблюдений, очевидно, что для результативного надзора в странах СНГ и Монголии над всеми видами ГЭ КРС, а также других видов ТГЭ, включая скрепи и ХИБ жвачных, необходимо усиление диагностики данных заболеваний с использованием надежных тест-систем. Еще более необходима для мониторинга ТГЭ заболеваний у диких и домашних животных разработка надежных тестов для преклинической (прижизненной) диагностики инфекционной формы прионов, а именно выявление PrPd в крови. Разработка таких методов осложняется не только вариабельностью вновь открываемых прионовых изоформ, но и высоким генетическим разнообразием экономически значимых видов жвачных животных.

## Литература

1. Григорьев В.Б. Прионы // Медицинская вирусология: Руководство / Под ред. академика Д.К. Львова, 2008; 240–245.
2. Григорьев В.Б., Кальнов С.Л., Покидышев А.Н., Цибезов В.В., Баландина М.В., Гибадулин Р.А., Верховский О.А., Клименко С.М. Фибрillизация рекомбинантного белка приона крупного рогатого скота (рек-PrP) *in vitro*. Доклады Академии наук. 2008; 40(2): 1–3.
3. Григорьев В.Б., Кальнов С.Л., Покидышев А.Н., Клименко С.М. Методы диагностики прионных заболеваний. Вопросы вирусологии. 2009; 5: 4–9.
4. Кальнов С.Л., Григорьев В.Б., Алексеев К.П., Власова А.Н., Гибадулин Р.А., Покидышев А.Н., Баландина М.В., Цибезов В.В., Верховский О.А. Получение и характеристика полноразмерного рекомбинантного PrP белка крупного рогатого скота. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; 141(1): 62–65.
5. Надточей Г.А., Шубин В.А., Юров К.П., Коромыслов Г.Ф. Экспериментальные прионные инфекции у животных. Труды ВИЭВ. 1999; 72: 299–305.
6. Покидышев А.Н. Характеристика рекомбинантного прионного белка крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и разработка методов выявления патологической изоформы прионов: дис. ... канд. биол. наук. НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. М., 2009; 138.
7. Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни. М.: РАМН, 2004; 1–350.
8. Полещук Н.Н., Григорьев В.Б., Кальнов С.Л., Верховский О.А., Курочкин И.Н., Капитулец С.П., Рубаник Л.В. Прионы: характеристика возбудителей, основные способы обнаружения и разработка новых способов прижизненной диагностики трансмиссивных губчатых энцефалопатий. Ж. Медицинские новости (изд. Республики Беларусь). 2005; 3(117): 29–34.
9. Рыбаков С.С., Гусева Е.В., Чепуркин А.В., Егоров А.А. Методические указания по гистологической диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота. М., 2001; 13.
10. Рыбаков С.С. Скрепи и другие прионные болезни; Владимир.: Фолиант, 2003.
11. Рыбаков С.С., Груздев К.Н. Клиническое проявление и диагностика губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота. Ветеринария. 2004; 7: 18–23.
12. Суворов В.С., Шубин В.А., Надточей Г.А., Юров К.П., Санджаев Д.Д.

- Патоморфологическая дифференциация прионных инфекций: скрепи овец и губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота. Труды ВИЭВ. 2003; 73: 60–63.
13. Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., van Keulen L., Schelcher F., Elsen J.M., Lantier F. Early accumulation of PrPSc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(12): 3115–3126.
  14. Angelo M., Bari D., Chianini F., Vaccari G., Esposito E., Conte M., Eaton S.L., Hamilton S., Finlayson J., Steele P.J., Dagleish M.P., Reid H.W., Bruce M., Jeffrey M., Agrimi U., Nonno R. The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2975–2985.
  15. Atarashi R., Wilham J.M., Christensen L., Hughson A.G., Moore R.A., Johnson L.M., Onwubiko H.A., Priola S.A., Caughey B. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat. Methods.* 2008; 5(3): 211–212. doi: 10.1038/nmeth0308-211.
  16. Atarashi R., Sano K., Satoh K., Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion.* 2011; 5(3): 150–153. doi: 10.4161/pri.5.3.16893.
  17. Baron T. Mouse models of prion disease transmission. *Trends. Mol. Med.* 2002; 8(10): 495–500.
  18. Barria M.A., Libori A., Mitchell G., Head M.W. Susceptibility of human prion protein to conversion by Chronic Wasting Disease prions. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(8): 1482–1489. doi: 10.3201/eid2408.161888.
  19. Buschmann A., Pfaff E., Reifenberg K., Müller H.M., Groschup M.H. Detection of cattle-derived BSE prion using transgenic mice overexpressing bovine PrPc. *Arch. Virol. Suppl.* 2000; 16: 75–86.
  20. Creminon C., Grassi J. Characterization of anti-PrP antibodies and measurement of PrP using ELISA techniques. Methods and tools in biosciences and medicine-techniques in prion research. Ed. Lehmann S, Grassi J. Birkhauser Verlag. Berlin. 2004; 17–131.
  21. DeArmond S.J., Prusiner S.B. Etiology and pathogenesis of prion diseases. *American Journal of Pathology.* 1995; 146(4): 785–811.
  22. Flechsig E., Weissmann C. The role of PrP in health and disease. *Curr. Mol. Med.* 2004; 4(4): 337–353. doi: 10.2174/1566524043360645.
  23. Hilton D.A., Ghani A.C., Conyers L., Edwards P., McCurdle L., Ritchie D., Penney M., Ironside J.W. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *Brit. Med. J.* 2002; 325(7365): 633–634.
  24. Hwang S., Greenlee J.J., Nicholson E.M. Role of donor genotype in RT-Quick seeding activity of chronic wasting disease prions using human and bank vole substrates. *PLoS One.* 2020; 15(1): e0227487.
  25. Hwang S., West Greenlee M.H., Balkema-Buschmann A., Groschup M.H., Nicholson E.M., Greenlee J.J. Real-Time Quaking-Induced Conversion Detection of Bovine Spongiform Encephalopathy Prions in a Subclinical Steer. *Front. Vet. Sci.* 2018; 4: 242. doi: 10.3389/fvets.2017.00242.
  26. Kim Chae, Xiangzhu Xiao, Shugui Chen, Tracy Haldiman et al. Artificial strain of human prions created *in vitro*. *Nat. Commun.* 2018; 9(1): 2166. doi: 10.1038/s41467-018-04584-z.
  27. Konold Timm, Gemma E. Bone, Derek Clifford, Melanie J. Chaplin, Saira Cawthraw, Michael J. Stack and Marion M. Simmons. Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. *BMC Veterinary Research.* 2012; 8: 22.

28. Korth C., Kaneko, Groth D., Heye N., Telling G., Mastrianni J., Parchi P., Gambetti P., Will R., Ironside J.K., Heinrich C., Tremblay P., DeArmond S.J., Prusiner S.B. Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100(8): 4784–4789.
29. O'Rourke K.I., Baszler T.V., Parish S.M., Knowles D.P. Preclinical detection of PrP-Sc in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. Vet. Rec. 1998; 142(18): 489–491.
30. O'Rourke K.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A., Ryder S.J., Parish S.M., Hamir A.N., Cockett N.E., Jenny A., Knowles D.P. Pre-clinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(9): 3254–3259.
31. Prusiner S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science. 1982; 216: 136–144.
32. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. Science. 1991; 252: 1515–1522.
33. Prusiner S.B. Prions. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998; 95(23): 13363–13383.
34. Saa P., Castilla J. and Soto C. Pre-symptomatic detection of prions in blood. Science. 2006; 313(5783): 92–94.
35. Saborio G.P., Permanne B. and Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature. 2001; 411(6839): 810.
36. Seed C.R., Hewitt P.E., Dodd R.Y., Houston F., Cervenakova L. Creutzfeldt-Jacob disease and blood safety. Vox. Sang. 2018; (3): 220–231. doi: 10.1111/vox.12631.
37. Sigurdson C.J., Nilsson K.P., Hornemann S., Manco G., Polymenidou M., Schwarz P., Leclerc M., Hammarström P., Wüthrich K., Aguzzi A. Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers. Nature Meth. 2007; 4(12): 1023–1030.
38. Spraker T.R., O'Rourke K.I., Gidlewski T. et al. Detection of the abnormal isoform of the prion protein associated with Chronic Wasting Disease in the optic pathways of the brain and retina of Rocky Mountain Elk (*Cervus elaphus nelsoni*). Vet. Pathol. 2010; 47: 536–546.
39. Spraker T.R., VerCauteren K.C., Gidlewski T., Schneider D.A., Munger R., Balachandran A., O'Rourke K.I. Antemortem detection of PrPCWD in preclinical, ranch-raised Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) by biopsy of the rectal mucosa. J. Vet. Diagn. Invest. 2009; 21(1): 15–24. doi: 10.1177/104063870902100103.
40. Stack M. Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies. Methods and tools in biosciences and medicine-techniques in prion research. Ed. Lehmann S., Grassi J. Birkhauser Verlag. Berlin. 2004; 97–116.
41. Qingzhong Kong, Mengjie Zheng, Cristina Casalone, Liuting Qing, Shenghai Huang et al. Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. J. Virol. 2008; 82(7): 3697–3701. doi: 10.1128/JVI.02561-07.
42. Wells G.A.H., McGill I.S. Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. Res. Vet. Sci. 1992; 53(1): 1–10.
43. Wells G.A.H. and Wilesmith J.W. Bovine Spongiform Encephalopathy and Related Diseases. In Prion Biology and Diseases. ed. S.B. Prusiner. 2004; 595–628.
44. Will R.C. Infectious and sporadic Prion Diseases. In Prion Biology and Diseases. ed. S.B. Prusiner. 2004; 654–671.
45. World Organization of Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2019. Режим доступа: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.05\\_BSE.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.05_BSE.pdf).

# **XI. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

*Шемельков Е.В., Соболева Г.Л., Кривонос А.В.*

Основные требования к лекарственному средству (ЛС) на всех этапах его жизни изложены в следующих нормативно-правовых документах:

- Федеральный закон № 61 от 12.04.2010 «Об обращении лекарственных средств»;
- Государственная фармакопея актуальной версии;
- «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств», утвержденные Приказом Минпромторга РФ от 14.06.2013 № 916 со всеми изменениями и дополнениями\*.

С 01 января 2021 года вместо Правил, утвержденных приказом № 916, в силу вступают «Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза», утвержденные Решением № 77 от 3 ноября 2016 г. Совета Евразийской экономической комиссии. По сути, новые наднациональные Правила являются переработанной и переосмысленной, в некоторых случаях более расширенной, версией действующих национальных Правил.

Современный этап развития производства ЛС, в том числе и иммунобиологических препаратов (вакцин), достиг того уровня, когда термин «качество» стал всеобъемлющим и включает себя не только контроль готового препарата по соответствующим показателям. Качество выпускаемой продукции обеспечивается следующими факторами:

1. Разработка лекарственного средства и перенос технологии его изготовления в промышленные условия. Началом

производства любого препарата является научный поиск, разработка концепции и последующее воплощение ее в экспериментальных условиях. В случае успешной разработки препарат проходит процедуру регистрации соответствующим уполномоченным органом (в РФ для ЛС, применяемых в ветеринарии, это Россельхознадзор). Согласно ФЗ № 61 «Об обращении лекарственных средств», к регистрации ЛС ветеринарного назначения предъявляются почти такие же требования, как и для медицинских препаратов, за исключением вопросов, касающихся этики.

2. Специализированные производственные помещения, в том числе так называемые «чистые» помещения. Планировочные и конструктивные решения помещений должны полностью обеспечить потребности производства в основных (производственные зоны, зона контроля качества, складские зоны) и вспомогательных (комнаты отдыха, душевые, мастерские, виварий и пр.) помещениях. Изначально планировка помещений под нужды конкретного производства должна быть осуществлена таким образом, чтобы создать все условия для его правильного функционирования. От планировки, конструктивных особенностей и оснащенности помещений зависят такие параметры, как соблюдение потоков при перемещении продукции на разных стадиях производства и отходов и недопущение их перекреста; эффективная очистка и дезинфекция; соблюдение режимов микроклимата (тем-

пература, влажность, запылённость) и биобезопасности (изготовление и фасовка в асептических условиях, защита окружающей среды); недопущение проникновения посторонних лиц и пр.

3. Соответствующее оборудование. Для эффективного производства требуется специализированное оборудование с высокой степенью автоматизации процессов, что минимизирует влияние человеческого фактора на качество продукции. Все сложное оборудование должно быть квалифицировано, а работы, проводимые на нем, проходить периодическую валидацию. Любое оборудование, оснащенное измерительными приборами, проходит регулярную калибровку и поверку в специализированных организациях.

4. Обученный персонал в достаточном количестве является ключевым фактором любого производственного процесса. На сложном оборудовании может работать только подготовленный персонал. Однако автоматизация работы имеет свои плюсы до определенной степени, и далеко не все этапы могут быть автоматизированы, особенно это актуально для иммунобиологического производства. Такие этапы, как выращивание культур клеток, работа с производственными и контрольными штаммами микроорганизмов, культивирование вирусов или бактерий невозможны без участия соответствующих высококвалифицированных специалистов, которые проходят регулярное обучение, повышение квалификации и аттестации.

5. Документация составляет неотъемлемую часть системы менеджмента качества фармацевтического предприятия, являясь ключевым элементом организации производства и контроля качества продукции. Правильно оформленная документация позволяет отследить весь жизненный цикл препарата от

входного сырья и материалов до выхода на потребительский рынок готового продукта и выявить все факторы, которые могут повлиять на его качество.

6. Непосредственно контроль качества продукции, который осуществляется на всех этапах производства и включает в себя:

- входной контроль сырья и материалов;
- промежуточный контроль полуфабрикатов на разных стадиях производственного процесса;
- контроль готовой продукции;
- контроль производственной среды;
- контроль стабильности качества препарата в процессе хранения.

Изготовление серии ЛС начинается с входного контроля сырья и материалов, при этом сами закупки могут быть осуществлены только у одобренных поставщиков, прошедших предварительную проверку и подтвердивших стабильность качества поставляемой продукции с учетом требований к соблюдению температурных режимов при хранении и транспортировке. Как правило, на крупных предприятиях создается обособленное подразделение в составе отдела контроля качества, которое занимается входным контролем сырья и материалов. Контроль проводится посерийно, по результатам которого выдается (или не выдается) разрешение на использование этой серии сырья или материалов в производстве. Обязательным аспектом входного контроля является сохранение арбитражных проб исследуемого сырья или материалов в течение срока, превышающего срок годности каждой серии препарата, при изготовлении которого они были использованы.

Промежуточный контроль подразумевает то, что полуфабрикат (промежуточный продукт), полученный после каждой технологической операции

(стадии производства), проходит соответствующий контроль согласно заданным требованиям и только после этого может быть использован в дальнейшей работе. Промежуточный контроль позволяет своевременно выявлять возможные отклонения и предотвращать использование полуфабрикатов, не отвечающих заданным требованиям, при изготовлении конечного продукта.

Контроль готового продукта осуществляется в обязательном порядке по показателям, заложенным в соответствующую нормативную документацию на препарат (СТО) или действующим фармакопейным статьям (ГФ). Критические показатели, по которым осуществляется контроль готового препарата, определяются на стадии его разработки с учетом действующих требований. Проведение контроля по этим показателям должно гарантировать, что выпущенный препарат будет безвредным для животного и обладать необходимой эффективностью (т.е. оказывать то целевое действие, ради которого он будет применяться).

Как правило, для иммунобиологических препаратов (в том числе и вакцин) закладываются следующие показатели:

– Описание внешнего вида препарата. Данный показатель необходим для того, чтобы потребитель мог соопасить внешний вид имеющегося у него продукта с тем, как он должен выглядеть в норме. Любое несоответствие описанию внешнего вида является основанием для отказа от использования этого препарата.

– Отсутствие контаминации посторонней микрофлорой; для инактивированных вакцин этот показатель может звучать как стерильность. Т.е. производитель в ходе испытаний подтверждает, что в препарате содержатся только производственные штаммы микроорганизмов (в случае живых вакцин) или

полностью отсутствуют живые микроорганизмы (в случае инактивированных вакцин).

– Безвредность. Чаще безвредность препарата оценивают на заранее подобранный лабораторной модели животных (белые мыши, морские свинки, кролики), а полученные результаты экстраполируют на целевых животных. При этом первоначально безвредность препарата оценивается непосредственно на целевых животных на стадии доклинических и клинических испытаний. Лабораторных животных и дозировку препарата подбирают с таким расчетом, чтобы они были более чувствительны, чем целевые животные, при введении препарата в рекомендованных дозах. Т.е. прохождение теста на безвредность на лабораторной модели гарантирует безвредность препарата для естественно-восприимчивых животных. В отдельных случаях необходимо подтвердить безвредность препарата не только для того животного, которое подвергается вакцинации, но и для других животных в стаде, которые не вакцинируются в данный момент. В частности, это актуально для некоторых живых вирусных вакцин, когда необходимо подтвердить отсутствие горизонтальной передачи вакцинного штамма вируса.

– Активность препарата. Один из наиболее сложных для оценки показателей в силу специфиности каждого конкретного препарата. Оценка активности препарата несет в себе цель — гарантировать то, что препарат способен выполнить свое функциональное предназначение. Для определения активности вакцин, как правило, подбирается чувствительная лабораторная модель животных, на которой оценивают антигенную либо иммуногенную активность препарата.

Под антигенной активностью подразумевается определение уровня специфических антител разными се-

рологическими методами (в реакциях нейтрализации, агглютинации, торможения гемагглютинации, ИФА и пр.) в сыворотке крови вакцинированных животных. Большую часть вирусных антигенов в инактивированных вакцинах оценивают по показателю «антигенная активность».

Иммуногенная активность — оценка способности вакцины защитить вакцинированное животное при заражении контрольным штаммом соответствующего микроорганизма. По показателю «иммуногенная активность» оценивают многие бактериальные компоненты вакцин (*P. multocida*, *E. rhusiopathiae* и др.), а также некоторые вирусные компоненты (вirus бешенства).

Оценка антигенной или иммуногенной активности конкретного вакцинного компонента на чувствительной лабораторной модели основывается на том, что если вакцина способна вызывать образование антител или защитить лабораторное животное от заражения, то аналогичный эффект будет оказан на организм целевого животного, что доказывается в период проведения доклинических и клинических испытаний.

Ввиду многообразия вакцинных антигенов и их свойств невозможно подобрать один или ограниченное количество универсальных методов оценки активности препаратов, отсюда возникает необходимость разработки метода оценки для каждого конкретного компонента.

Для некоторых компонентов (чаще всего это живые вирусные или бактериальные вакцины) метод оценки антигенной или иммуногенной активности может быть заменен на определение инфекционной активности самого производственного штамма микроорганизма, содержащегося в 1 дозе вакцины. Т.е. определяется, сколько живого вируса или живых бактерий содержится в при-

вивной дозе вакцины и, с учетом ранее проведенных исследований, выдается заключение об активности препарата.

В настоящее время ведутся активные работы по поиску альтернативных методов оценки активности и безвредности препаратов, которые бы минимизировали использование лабораторных животных (по этическим соображениям), а также возможности заменить оценку иммуногенной активности (требующую заражения животных вирулентными штаммами) на оценку антигенной активности, которая более гуманна и безопасна для окружающей среды. Однако далеко не для всех вакцинных антигенов удается это сделать, в то же время основным приоритетом остается безопасность и эффективность (активность) препаратов для естественно-восприимчивых животных.

В зависимости от типа и вида вакцинного препарата для контроля его качества могут быть внесены и другие показатели: полнота инактивации вирусов или бактерий, концентрация водородных ионов (уровень pH), остаточная влажность, наличие вакуума, растворимость и др.

Проведение контроля качества продукции оформляется соответствующими протоколами, а по итогу контроля выдается паспорт качества на каждую серию готового продукта.

Помимо контроля качества самого препарата, обязательным является контроль производственной среды, т.е. тех условий, в которых этот препарат (серия препарата) был изготовлен. Сюда относятся всевозможные контроли параметров микроклимата, микробной контаминации воздуха, поверхностей помещений и оборудования, рук персонала, контроли прохождения стерилизации и пр. Контроль производственной среды гарантирует, что процесс изготовления препарата на всех стадиях производства происходил

в условиях, отвечающих требованиям, предъявляемым к производству лекарственных средств.

Согласно требованиям приказа № 916 «Правила надлежащей производственной практики» и ГФ, на фармацевтическом предприятии должна быть внедрена программа испытания стабильности каждого наименования продукции в процессе хранения, которая предусматривает дополнительный контроль препаратов по всем показателям качества (внешний вид, стерильность, безвредность, активность и др.), заложенным в нормативную документацию, через определенные промежутки времени в течение и по окончании срока годности препарата. Для иммунобиологических препаратов контроль стабильности в процессе хранения проводится по следующей схеме: первый год хранения — через каждые 3 месяца, второй год хранения — через каждые 6 месяцев, третий и последующие годы

хранения — один раз в год. Полученные результаты контроля должны соответствовать требованиям нормативной документации, в противном случае серия препарата отзывается с реализации, а его производство приостанавливается до выяснения причин выявленного несоответствия.

## Контроль качества сторонними организациями (внешний контроль)

Помимо контроля качества, проводимого внутри организации-производителя, каждый препарат обязательно проходит испытания по всем показателям качества в сторонних организациях. В Российской Федерации все испытания вакцины проходят в ФГБУ «ВГНКИ» (табл. 1), при регистрации за рубежом — в соответствующем контрольно-испытательном органе страны.

Таблица 1. Виды и периодичность внешнего контроля качества

№ п/п	Виды испытаний (контроля)	Периодичность	Примечание
1	Регистрационный	При проведении регистрации препарата	Регистрация проводится дважды: первичная — на новые препараты, повторная — через 5 лет использования препарата потребителями
2	Сертификационный*	Регулярно, при получении сертификатов соответствия	—
3	Инспекционный	Регулярный контроль за сертифицированной продукцией, не реже одного раза в год	—
4	Федеральный государственный фармаконадзор в сфере обращения лекарственных средств	Регулярно в соответствии с годовым планом Россельхознадзора	Образцы препарата отбираются представителями территориального управления Россельхознадзора из торговой сети или с мест применения

По результатам проведения внешнего контроля:

- выдается (или не выдается) регистрационное удостоверение,
- подтверждался (или не подтверждался) сертификат соответствия качества производимой продукции требованиям НД,
- подтверждается разрешение на реализацию препарата или препарат отзывается из продажи, включая розничные сети.

Следует отметить, что в РФ обязательными документами для производства, контроля и поступления препарата в торговую сеть являются регистрационное удостоверение, сертификат соответствия (до ноября 2019 г. или документа о вводе в гражданский оборот — в перспективе) и паспорт качества.

## Литература

1. Государственная фармакопея XIV.
2. Комментарий к Руководству Европейского союза по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека и применения в ветеринарии / Под ред. Быковского С.Н., проф., д.х.н. Василенко И.А., Кэмпбелл Д.Р., проф., д.ю.н. Максимов С.В., Мешковский А.П., к.т.н. Незнанов В.П., к.т.н. Спицкий О.Р. — 2-е изд. — М.: Перо, 2016.
3. Морозова Т.Е., Хосева Е.Н. Актуальные вопросы контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств отечественного производства // Клиническая фармакология и терапия. — 2012. — № 2. — С. 54–58.
4. Нифантьев О.Е. Основные принципы инспектирования систем качества на фармацевтических предприятиях // Фарматека. — 2004. — № 1(37).
5. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств, утвержденные Приказом Минпромторга РФ № 916 от 14.06.2013.
6. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза, утвержденные Советом Евразийской экономической комиссии. Решение № 77 от 3 ноября 2016.
7. Федеральный закон № 61 от 12.04.2010 «Об обращении лекарственных средств».

## **XII. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРОВ РУКОВОДСТВА ПО ВОПРОСАМ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА за 1990–2020 гг.**

1. Алешкин А.В., Лайшевцев А.И., Зулькарнеев Э.Р., Смирнов Д.Д., Киселева И.А., Капустин А.В., Якимова Э.А., Пименов Н.В., Рубальский Е.О., Ленев С.В., Гапотченко К.О. Антибактериальная композиция на основе штаммов бактериофагов для профилактики или лечения сальмонеллеза и/или эшерихиоза сельскохозяйственных животных или птиц, или человека. Патент на изобретение RU 2705302 C1, 06.11.2019.
2. Алипер Т.И., Попова Н.И., Непоклонов Е.А., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В. ПЦР в реальном времени для диагностики туберкулеза. Ветеринарная жизнь. 2006; 7–8: 13.
3. Альбертиян М.П., Гулюкин А.М., Искандаров М.И., Забережный А.Д., Племяшов К.В., Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Федоров В.И., Павлова А.И., Корякина Л.П. Иммунологическая, патоморфологическая оценка эффективности противобруцеллезных вакцин при специфической профилактике бруцеллеза сельскохозяйственных животных. Посвящается светлой памяти организатора производства и науки в Якутии, доктора сельскохозяйственных наук Степанова Айаала Ивановича. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН. Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М.Г. Сафонова. Новосибирск, 2019.
4. Аронова Е.В., Власова Н.Н. Вакцины нового поколения для профилактики чумы крупного рогатого скота. Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей. Международная научно-практическая конференция. 2002; 93–95.
5. Аронова Е.В., Власова Н.Н., Цыбанов С.Ж., Перзашкевич В.С. Клонирование фрагментов генома вируса чумы крупного рогатого скота. Генодиагностика инфекционных заболеваний. IV Всероссийская научно-практическая конференция. 2002; 320–323.
6. Аскерова С.А., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М., Искандаров М.И., Лайшев К.А., Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Федоров В.И., Захарова О.И., Павлова А.И. Модифицированные методы диагностики бруцеллеза сельскохозяйственных животных. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко. Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М.Г. Сафонова. Новосибирск, 2019.
7. Белименко В.В., Гулюкин А.М., Христиановский П.И., Малышева Н.С., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Исаев Ю.Г., Шабейкин А.А., Ершова Т.А., Капустин А.В., Лайшевцев А.И., Степанова Т.В., Заболотная И.М. Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия,

- установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов трихомоноза крупного рогатого скота. Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных (Гулюкин М.И., Гулюкин А.М., Искандаров М.И., Чернов А.Н., Шабейкин А.А., Белименко В.В., Племяшов К.В., Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Федоров В.И.). Новосибирск, 2019; 290–305.
8. Белоусов В.И., Малахов Ю.А., Ситьков В.И., Соболева Г.Л., Усольцев В.М. Способ изготовления вакцины против лептоспироза животных. Патент на изобретение RU 2088258 С1, 27.08.1997.
9. Бондаренко В.З., Скляров О.Д., Игнатова С.В., Фёдоров А.И., Искандарова С.С., Имашева М.А., Лысенко А.А., Черных О.Ю. Применение препарата изготовленного на основе редкоземельных элементов для профилактики и лечения маститов у коров. Ветеринария Кубани. 2018; 4: 8–11.
10. Верховский О.А. Моноклональные антитела в ветеринарной иммунодиагностике. Ветеринария и кормление. 2017; 3: 20–21.
11. Верховский О.А., Алипер Т.И. ИФА для выявления антител к вирусу блютанга в сыворотке крови жвачных. Ветеринария. 2008; 12: 7–10.
12. Верховский О.А., Кальнов С.Л., Балакшин В.В., Чистяков А.Н. Способ продления жизни больных прионными болезнями. Патент на изобретение RUS 2353379. 26.01.2005.
13. Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.А. Динамика содержания -интерферона в крови крупного рогатого скота при туберкулезе. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 121–123.
14. Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.Х. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулёзе крупного рогатого скота. Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. К 100-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора ветеринарных наук, профессора, академика ВАСХНИЛ Якова Романовича Коваленко. 2006; 180–185.
15. Верховский О.А., Найманов А.Х., Савицкая О.Х. Использование метода «сэндвич»-ИФА для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Сб. науч. трудов ВНИИБТЖ. Омск, 2001; 173–175.
16. Верховский О.А., Поляков В.Ф., Алипер Т.И. Разработка и внедрение в практику методов иммунодиагностики инфекционных заболеваний животных. Ветеринария и кормление. 2018; 6: 6–8.
17. Верховский О.А., Цибезов В.В., Баландина М.В., Непоклонова И.В. Иммуноферментный анализ в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария. 2002; 12: 8.
18. Власова Н.Н., Аронова Е.В., Цыбанов Я.С. Обнаружение РНК вируса чумы крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции. Биологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей. Международная научно-практическая конференция. 2002; 103–105.
19. Войтова К.В., Глотов А.Г., Семенова О.В., Глотова Т.И. Респираторно-синцитиальная инфекция КРС и ее диагностика. Saarbrucken. 2014.
20. Гаффаров Х.З., Иванов А.В., Непоклонов Е.А., Равилов А.З. Моно- и смешанные инфекции новорожденных телят. Казань, 2002; 34.
21. Генджиева О.Б., Гулюкин М.И. Эпизоотология лейкоза в мясном скотоводстве. Ветеринария. 2012; 7: 23–26.

22. Глотов А.Г. Инфекционный риноторахеит крупного рогатого скота: причины и методы борьбы. Аграрная наука. 2018; 11–12: 15.
23. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Вирусная диарея: значение в патологии воспроизводства крупного рогатого скота. Ветеринария. 2015; 4: 3–8.
24. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пастевирысы крупного рогатого скота. Сельскохозяйственная биология. 2015; 50(4): 399–408.
25. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Роль возбудителя вирусной диареи — болезни слизистых оболочек в этиологии респираторных патологий крупного рогатого скота. Ветеринария. 2017; 6: 3–12.
26. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Роль ви-  
руса инфекционного риноторахеита в  
патологии воспроизводства крупного  
рогатого скота. Ветеринария. 2018; 3:  
3–9.
27. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Стра-  
тегия и принципы контроля вирусной  
диареи крупного рогатого скота. Вете-  
ринария. 2018; 8: 3–12.
28. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Влияние  
колоstralального иммунитета на эффе-  
ктивность вакцинации телят против ви-  
русных инфекций (обзор литературы).  
Ветеринария. 2019; 6: 3–11.
29. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Саль-  
монеллез крупного рогатого скота на  
молочных комплексах (Обзор. Часть 1).  
Ветеринария. 2020; 2: 3–7.
30. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Саль-  
монеллез крупного рогатого скота на  
молочных комплексах (Обзор. Часть 2).  
Ветеринария. 2020; 3: 3–7.
31. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Войтова  
К.В. Особенности диагностики респи-  
раторных болезней крупного рогатого  
скота, вызываемых РНК-содержащими  
вирусами (ВД, ПГ-3, РСИ и коронави-  
русная инфекция). Аграрная наука —  
сельскохозяйственному производству  
Монголии, Сибири и Казахстана. Сбор-  
ник научных докладов 13 Международ-  
ной научно-практической конферен-  
ции. 2010; 85–90.
32. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Войто-  
ва К.В., Терентьева Т.Е., Зайцев Ю.Н.,  
Разумовская В.В., Путинцев В.П. Осо-  
бенности проявления легочного пасти-  
реллеза молодняка крупного рогатого  
скота в хозяйствах по производству мо-  
лока. Сибирский вестник сельскохо-  
зяйственной науки. 2012; 2(225): 55–61.
33. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Зайцев  
Ю.Н., Пьянков О.В., Сергеев А.Н.,  
Гулюкин М.И. Патогенность нецито-  
патогенных изолятов вируса вирусной  
диареи — болезни слизистых оболочек  
для серонегативных телят. Вопросы ви-  
русологии. 2014; 59(4): 46–49.
34. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Зайцев  
Ю.Н., Терентьева Т.Е. Болезни крупно-  
го рогатого скота, вызываемые бакте-  
риями семейства Pasteurellaceae. Мето-  
дическое пособие. Новосибирск, 2013.
35. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Коте-  
нева С.В., Нефедченко А.В., Войтова  
К.В. Эпизоотическая ситуация по ре-  
спираторно-синцитиальной инфекции  
крупного рогатого скота в хозяйствах  
по производству молока. Ветеринария.  
2010; 7: 21–25.
36. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Коте-  
нева С.В., Нефедченко А.В., Семенова  
О.В. Вспышка заболевания крупного  
рогатого скота, вызванная вирусом ди-  
ареи второго вида. Ветеринария. 2019;  
3: 3–8.
37. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Коте-  
нева С.В., Семенова О.В., Судоргина  
Т.Е., Никонова А.А. Комплексная си-  
стема диагностических мероприятий  
при смешанных вирусно-бактериаль-  
ных инфекциях респираторного тракта  
крупного рогатого скота. Методиче-  
ское пособие. Новосибирск, 2016.
38. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефед-  
ченко А.В., Гребенникова Т.В., Алипер  
Т.И. Применение ПЦР для диагности-  
804

- ки вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. Ветеринария. 2007; 12: 27–29.
39. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Родин И.А., Кощаев А.Г. Респираторные болезни крупного рогатого скота вирусно-бактериальной этиологии. Учебное пособие. Краснодар, 2017.
40. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Родин И.А., Кощаев А.Г. Вирусные и бактериальные болезни крупного рогатого скота при интенсивном ведении молочного животноводства. Краснодар, 2019.
41. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В. Проявление инфекционного ринотрахеита у телят раннего возраста. Ветеринария. 2013; 12: 11–14.
42. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Войтова К.В. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах. Ветеринария. 2014; 4: 7–11.
43. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Котенева С.В., Никонова А.А. Индикаторы циркуляции возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах в условиях Сибири. Сельскохозяйственная биология. 2016; 51(4): 483–490.
44. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А. Длительность и напряженность пассивного и приобретенного иммунитета к респираторным вирусам у телят на молочных комплексах. Ветеринария. 2019; 1: 3–9.
45. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Строганова И.Я. Вирусные болезни крупного рогатого скота при интенсивном ведении молочного животноводства. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. Красноярский государственный аграрный университет. Красноярск, 2010.
46. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Особенности проявления вирусной диареи — болезни слизистых оболочек у племенных быков. Ветеринария. 2012; 12: 3–6.
47. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Пестивирусы жвачных животных. Вопросы вирусологии. 2016; 61(2): 59–62.
48. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2009; 54(5): 43–47.
49. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Трегубчак Т.В., Максютов Р.А. Молекулярная эпизоотология вирусной диареи крупного рогатого скота в Сибири. Ветеринария. 2017; 12: 14–20.
50. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максютов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. Вопросы вирусологии. 2018; 63(4): 185–191.
51. Глотов А.Г., Краснов В.В., Глотова Т.И. Эффективность вакцинации при профилактике абортов, вызванных вирусом диареи крупного рогатого скота. Вестник КрасГАУ, 2010; 8(47): 89–94.
52. Глотов А.Г., Краснов В.В., Глотова Т.И., Шкиль Н.А. Специфическая профилактика абортов вирусной этиологии у крупного рогатого скота. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2010; 4(208): 76–81.
53. Глотова Т.И., Глотов А.Г., Терентьева Т.Е., Кунгурцева О.В., Войтова К.В. Пастереллез крупного рогатого скота на молочных комплексах: частота выделения и характеристика культур. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2012; 3: 32–35.
54. Глотова Т.И., Никонова А.А., Глотов А.Г. Противовирусные соединения и препараты, эффективные в отношении

- нии вируса вирусной диареи крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2017; 62(5): 204–210.
55. Глотова Т.И., Никонова А.А., Глотов А.Г. Перспективы применения препаратов растительного происхождения при вирусной диарее крупного рогатого скота. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2020; 1: 220–222.
56. Глотова Т.И., Никонова А.А., Котенева С.В., Глотов А.Г. Способ борьбы с персистентной инфекцией при вирусной диарее. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019; 49(2): 49–56.
57. Глотова Т.И., Семенова О.В., Котенева С.В., Глотов А.Г. Выявление ассоциаций вирусов и бактерий респираторного комплекса у импортного скота при острых вспышках бронхопневмоний на молочных комплексах. Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. 2014; 2(7): 355–358.
58. Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2017; 47(1): 90–96.
59. Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В., Кальнов С.Л., Непоклонов Е.А., Шумской Н.И. Дифференциальная диагностика микобактерий методом полимеразной цепной реакции. Ветеринария. 1999; 3: 17–20.
60. Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Грабовецкий В.В., Бикетов С.Ф., Кальнов С.Л., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Детекция экспрессии генов микобактерий в культуре макрофагов и образцах от животных и человека. Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. 2-я Международная конференция. М., 2000.
61. Гребенникова Т.В., Кальнов С.Л., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулеза. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 92–93.
62. Грибенча С.В., Лосич М.А., Грибенча Л.Ф., Непоклонова И.В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка — главного иммуногена вируса бешенства. Вопросы вирусологии. 2012; 57(3): 44–48.
63. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. Вопросы вирусологии. 2013; 58(5): 38–43.
64. Григорьев В.Б., Кальнов С.Л., Покидышев А.Н., Цибезов В.В., Баландина М.В., Гибадулин Р.А., Верховский О.А., Клименко С.М. Фибрillизация рекомбинантного белка приона крупного рогатого скота (РЕК-PRP) *in vitro*. Доклады Академии наук. 2008; 420(2): 254–256.
65. Гулюкин М.И. Лейкоз крупного рогатого скота: основные причины и пути решения проблемы. Материалы VI Международного ветеринарного конгресса. 2016; 80–85.
66. Гулюкин М.И., Альберян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И. История вакцинопрофилактики бруцеллеза крупного рогатого скота в России. Ветеринария и кормление. 2014; 5: 50–52.
67. Гулюкин М.И., Альберян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С. Эффективность мероприятий, проводимых против бруцеллеза крупного рогатого скота, в Российской Федерации. Ветеринария. 2016; 12: 24–28.
68. Гулюкин М.И., Альберян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Ко-

- ломыцев С.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных в Российской Федерации. Ветеринария. 2013; 6: 23–28.
69. Гулюкин М.И., Барабанов И.И., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Козырева Н.Г., Симонян Г.А., Тимошина С.В., Гулюкин А.М., Василевич Ф.И., Меньшикова З.Н., Донченко А.С., Донченко Н.А., Разумовская В.В., Храмцов В.В., Донник И.М., Коломыцев С.А., Безгин В.М., Козлов В.Е., Барсуков Ю.И., Левкович Н.Г. и др. Мониторинг эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в товарных и племенных хозяйствах Российской Федерации за 2014 и 2015 гг. Ветеринария и кормление. 2016; 4: 5–41.
70. Гулюкин М.И., Барабанов И.И., Степанова Т.В., Иванова Л.А., Козырева Н.Г. Методы борьбы с лейкозом. Молочная промышленность. 2018; 8: 71.
71. Гулюкин М.И., Горбатов А.В., Соколова Н.А., Мниковая Л.А., Ишкова Т.А. Разработка вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колиинтеритов телят. Ветеринария и кормление. 2014; 5: 52–54.
72. Гулюкин М.И., Забережный А.Д., Юрлов К.П., Шабейкин А.А., Барабанов И.И., Степанова Т.В., Лопунов С.В. Научно-обоснованная модель противоэпизоотических мероприятий при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление/ 2018; 1: 4–7.
73. Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Барабанов И.И., Козырева Н.Г. Контроль и тенденции изменения эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота в 2000–2016 гг. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 11(71): 530–537.
74. Гулюкин М.И., Искандаров М.И., Гулюкин А.М., Федоров А.И., Искандарова С.С., Исаев Ю.Г., Скляров О.Д., Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Захарова О.И., Донченко Н.А., Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В., Аракелян П.К. Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов бруцеллоза. Методические рекомендации. М., 2020.
75. Гулюкин М.И., Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Вальциферова С.В., Степанова Т.В., Аноятбеков М. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови. Вопросы вирусологии. 2019; 64(4): 173–177.
76. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г. Распространение лейкоза крупного рогатого скота и генетические варианты возбудителя на территории животноводческих хозяйств Центрального федерального округа Российской Федерации. Ветеринария Кубани. 2017; 6: 4–9.
77. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Калабеков И.М., Малоголовкин А.С., Павлова А.И. Выявление ДНК провируса лейкоза КРС методом ПЦР и пробоподготовка полученного генетического материала с целью дальнейшего определения нуклеотидной последовательности методом секвенирования. Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск, 2019; 226–257.
78. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В. Применение современных молекулярно-генетических методов в диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Популяционное здоровье животных и эмерджентные инфекции в современных условиях. Материалы международное научно-практической конференции. 2013; 19–24.

79. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В. Лейкоз крупного рогатого скота. Современное возврение на молекулярно-генетические методы его диагностики. Главные эпизоотологические параметры популяции животных. Сборник научных трудов ФГБОУ ВПО НГСХА, представленных на 2-й сессии Международной научно-практической конференции. Под редакцией В.В. Сочнева. 2015; 55–62.
80. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкина И.А. Генетический полиморфизм вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации. Российская сельскохозяйственная наука. 2016; 5: 56–59.
81. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Клименко А.И., Коваленко А.В., Дробин Ю.Д., Василенко В.Н. Межвидовая передача вируса лейкоза крупного рогатого скота в эксперименте. Вопросы вирусологии. 2015; 60(5): 32–37.
82. Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Коваленко А.В., Горячева Г.А. Генотипическое разнообразие вируса лейкоза КРС, циркулирующего на территории Ростовской области. Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных. Материалы международной научно-практической конференции. 2018; 108–113.
83. Гулюкин М.И., Клименко А.И., Овдиенко Н.П., Хабузов И.П., Найманов А.Х., Василенко В.Н., Лодянов В.В. Микобактерии и микобактериальные инфекции животных. С.-Пб. Лань: 2018; 304.
84. Гулюкин М.И., Ломакина Н.Ф., Храмцов В.В., Осипова Н.А., Разумовская В.В. Полиморфизм гена ENV вируса лейкоза, присутствующего в Российской Федерации. Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел. Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. 2011; 48–50.
85. Гулюкин М.И., Мникова Л.А., Ишкова Т.А., Соколова Н.А., Жидков С.А. Разработка и внедрение в практику эффективной системы диагностики и профилактики вирусных желудочно-кишечных болезней крупного рогатого скота. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2015; 78: 179.
86. Гулюкин М.И., Найманов А.Х., Альбертиян М.П., Симонян Г.А., Иванова Л.А., Барабанов И.И., Козырева Н.Г., Степанова Т.В., Гулюкин А.М., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С., Смирнов А.М., Попов Н.И., Бутко М.П., Бричко В.Ф., Донченко А.С., Донченко Н.А. и др. Практическое пособие по мониторингу бруцеллеза, туберкулеза, паратуберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: организационно-хозяйственные, ветеринарно-санитарные и зоогигиенические аспекты профилактики и ликвидации этих инфекций. М., 2014.
87. Гулюкин М.И., Найманов А.Х., Ведерников В.А., Толстенко Н.Г., Букова Н.К., Яременко Н.А. Оздоровительные мероприятия при туберкулезе крупного рогатого скота. Ветеринария. 2012; 1: 3–8.
88. Гулюкин М.И., Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Кучерук О.Д., Сошникова Е.М., Нулатинов Р.А. Способ изготовления аллергена для дифференциальной диагностики параллергических реакций у крупного рогатого скота на ППД туберкулин для

- млекопитающих. Патент на изобретение RU 2443428 С1 от 27.02.2012.
89. Гулюкин М.И., Симонян Г.А., Барбанов И.И., Иванова Л.А., Грек К.П., Козырева Н.Г., Ломакина Н.Ф., Храмцов В.В., Амироков М.А., Разумовская В.В., Донник И.М., Татарчук А.Т., Красноперов В.А., Клименко А.И., Коваленко А.В. Методические рекомендации по оздоровлению племенных хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота. Современные средства и методы обеспечения ветеринарного благополучия по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчёл. М., 2011; 20–24.
90. Гулюкин М.И., Степанова Т.В., Иванова Л.А., Козырева Н.Г., Шабейкин А.А., Коломыцев С.А., Лопунов С.В., Барсуков Ю.И. Распространение и меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота в Центральном федеральном округе. Ветеринария и кормление. 2019; 6: 8–14.
91. Гулюкин М.И., Степанова Т.В., Коваленко А.В., Горячева Г.А., Клименко А.И. Возможность передачи вируса лейкоза крупного рогатого скота гетерологичным видам животных в условиях эксперимента. Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных. Материалы всероссийской научно-практической конференции. 2017; 95–100.
92. Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей — болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. Вопросы вирусологии. 2013; 58(6): 13–18.
93. Данилюк А.В., Капустин А.В. Распространенность и видовое разнообразие клостридий — возбудителей анаэробных инфекций крупного рогатого скота. Материалы IX Международного ветеринарного конгресса. Светлогорск. 2019; 19–26.
94. 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. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2018; 1(25): 124–128.
95. Дегтяренко Л.В., Гордиенко Л.Н., Власенко В.С., Гулюкин М.И., Альберян М.П., Искандаров М.И., Гулюкин А.М., Федоров А.И., Искандарова С.С., Скляров О.Д., Калядин Д.В. Методы иммунологической оценки животных, сенсибилизованных измененными формами бруцелл. М.-Омск., 2017.
96. Дегтяренко Л.В., Разница Г.В., Карлова М.Ю., Каликин И.Н., Скляров О.Д., Зинова А.А., Калягин Д.В. Контроль поствакцинального иммунного ответа у крупного рогатого скота, иммунизированного противобруцеллезными слабоагглютиногенными вакцинами из штаммов 82, 75/79-АВ. Омск, 2010.
97. Дегтяренко Л.В., Скляров О.Д. Новые дифференциально-диагностические тесты молока крупного рогатого скота на бруцеллез. Аграрная наука — сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии. Сборник научных докладов XVII международной научно-практической конференции в 2 ч. 2014; 96–98.
98. Дегтяренко Л.В., Скляров О.Д. Перспективность применения дифференциальных экспресс-тестов при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота. Достижения науки и техники АПК. 2015; 29(4): 58–60.
99. Денисенко Г.Ф., Ленев С.В., Малахов Ю.А., Панин А.Н., Рахманин П.П.,

- Саркисов А.Х., Ситьков В.И., Соболева Г.Л. Получение высокоэффективных вакцин против инфекционных болезней животных. Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применения в ветеринарной практике. Всероссийская научно-практическая конференция. 2000; 7–8.
100. Денисов А.А., Карпова О.А., Коробовцева Ю.С., Скляров О.Д., Климанов А.И., Михина Л.В., Третьякова А.В., Брынских М.Н., Шумилов К.В., Боровик Р.В. Баллистический способ доставки живых противобруцеллёзных вакцин. Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2010; 5(3): 88–93.
101. Донник И.М., Гулюкин М.И., Бусол В.А., Кривоногова А.С., Петровавловский М.В., Исаева А.Г., Коваленко А.М. К вопросу вакцинопрофилактики лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани. 2020; 1: 3–6.
102. Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О., Колбасов Д.В., Жигалева О.Н., Цыбанов С.Ж., Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д. Генодиагностика сибирской язвы. Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. 2006; 4: 26–28.
103. Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Яковлев С.С., Пирожков М.К., Панин А.Н. Латексная тест-система для быстрой серологической диагностики лептоспироза у животных. Ветеринария. 2014; 3: 24–28.
104. Жданов В.М., Львов Д.К., Забережный А.Д. Место вирусов в биосфере. Вопросы вирусологии. 2012; S1: 21–32.
105. Забережный А.Д., Костина Л.В., Южаков А.Г., Гулюкина И.А., Степанова Т.В., Страффорд В.В., Полякова И.В., Дроздова Е.И. Современная таксономия вирусов. Ветеринария и кормление. 2017; 1: 4.
106. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. Вопросы вирусологии. 2017; 62(3): 101–108.
107. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Елаков А.Л., Гулюкин А.М., Метлин А.Е. Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год. Вопросы вирусологии. 2020; 65(1): 41–48.
108. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Усольцев К.В., Гулюкин А.М., Александрова Н.М., Южаков А.Г., Сабирова В.В., Чернов А.Н., Иванов А.А., Забережный А.Д., Самерханов И.И., Паршикова А.В., Фаизов Т.Х. Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (OT-ПЦР). Патент на изобретение RUS 2575088 от 02.10.2014.
109. Иванов О.В., Верховская А.Е., Иванова О.Ю., Федоров Ю.Н., Верховский О.А. Влияние вакцинации на иммунологическую реактивность и эффективность серологической диагностики лейкоза у телят. Ветеринарный врач. 2009; 1: 23–25.
110. Иванов О.В., Верховский О.А. Влияние вакцинации на качество серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2009; 1–1: 43–45.

111. Иванов О.В., Иванова О.Ю., Федотов В.П., Баландина М.В., Верховский О.А., Федоров Ю.Н. Возрастная динамика содержания антител к вирусу лейкоза у телят, рожденных от серопозитивных коров. Сельскохозяйственная биология. 2008; 43(6): 87–92.
112. Иванов О.В., Иванова О.Ю., Федотов В.П., Брезгина Т.И., Монова Н.Г., Баландина М.В., Верховский О.А. Эффективность серологических методов исследования при лейкозе крупного рогатого скота. Ветеринария. 2008; 7: 6–8.
113. Иванов О.В., Федотов В.П., Брезгина Т.И., Крючкова Е.Н., Монова Н.Г., Верховский О.А. Влияние гельминтозного фактора на динамический уровень противолейкозных антител у коров. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2009; 1–1: 152–154.
114. Иванов О.В., Федотов В.П., Крючкова Е.Н., Брезгина Т.И., Верховский О.А. Об эффективности сeroдиагностики лейкоза коров при тромбодозной инвазии. Сельскохозяйственная биология. 2009; 44(2): 111–113.
115. Ильина Е.Н., Солопова О.Н., Балабашин Д.С., Ларина М.В., Алиев Т.К., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Свешников П.Г., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Получение и характеристизация нейтрализующего моноклонального антитела против вируса бешенства. Биоорганическая химия. 2019; 45(1): 58–68.
116. Искандаров М.И., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М., Искандарова С.С., Альбертиян М.П., Федоров А.И., Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Федоров В.И. Бруцеллез животных в России. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. Новосибирск, 2017.
117. Искандарова С.С., Бондаренко В.З., Федоров А.И., Искандаров М.И., Горбатов А.В., Юмашева М.А., Альбертиян М.П., Гулюкин М.И. Средство для профилактики мастита у крупного рогатого скота. Патент на изобретение RU 2605631 C1 от 27.12.2016.
118. Искандарова С.С., Федоров А.И., Искандаров М.И., Гулюкин М.И. Разработка, изучение и применение защитно-профилактического средства на основе лантаноидов для профилактики мастита и защиты кожных покровов животных от неблагоприятных факторов внешней среды. Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск, 2019; 206–225.
119. Калабеков И.М., Жигалева О.Н., Власова Н.Н., Цыбанов С.Ж., Колбасов Д.В., Снетков К.А., Гузалова А.Г. Олигонуклеотидные праймеры, способ и тест-система для выявления генома вируса блютанга методом полимеразной цепной реакции в формате электрофоретической детекции продуктов амплификации. Патент РФ на изобретение 2385943 C2 от 10.04.2010.
120. Кальнов С.Л., Григорьев В.Б., Алексеев К.П., Власова А.Н., Гибадулин Р.А., Покидышева А.Н., Баландина М.В., Цибезов В.В., Верховский О.А. Получение и характеристика полноразмерного рекомбинантного РГРС белка крупного рогатого скота. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; 141(1): 68–71.
121. Кальнов С.Л., Верховский О.А., Цибезов В.В., Алексеев К.П., Чудакова Д.А., Филатов И.Е., Гребенникова Т.В. Прижизненная диагностика прионных болезней. Вопросы вирусологии. 2020; 65(6): 326–334.
122. Калядин Д.В., Скляров О., Климанов А., Шунаева Н. Бруцеллез жи-

- вотных — диагностика, профилактика, искоренение болезни. Материалы V Международного ветеринарного конгресса, 2015; 65–69.
123. Капитулец С.П., Полещук Н.Н., Капитулец Н.Н., Красочки П.А., Кальнов С.Л., Верховский О.А. Антиприонная активность экстракта бересты при экспериментальном скрепи. Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2006; 3: 45–52.
124. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота. Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011; 53–54.
125. Капустин А.В. Способы контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против инфекционных болезней крупного рогатого скота, вызванных различными видами бактерий рода *Clostridium* spp. Ветеринария и кормление. 2017; 3: 47–49.
126. Капустин А.В., Алипер Т.И. Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота. Материалы VII Международного ветеринарного конгресса. М., 2017; 106–108.
127. Капустин А.В., Лайшевцев А.И. Специфическая профилактика мастиц у крупного рогатого скота. Материалы VIII Международного ветеринарного конгресса. М., 2018; 114–116.
128. Капустин А.В., Лайшевцев А.И., Скляров О.Д., Абросимова Н.С. Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 3(63): 170–175.
129. Капустин А.В., Моисеева Н.В., Лайшевцев А.И., Лучко М.А., Яцентюк С.П., Горбачёва Н.С. Гистофилёз крупного рогатого скота. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 10(70): 319–326.
130. Капустин А.В., Моторыгин А.В. Этиологическая структура эшерихиоза телят. Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011; 48–49.
131. Капустин А.В., Моторыгин А.В., Букова Н.К. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота. Вестник ветеринарии. 2013; 1(64): 71–73.
132. Капустин А.В., Скляров О.Д., Алипер Т.И., Лайшевцев А.И. Изучение эффективности применения поливалентной вакцины «КЛОСТБОВАК-8» на неблагополучном по злокачественному отёку, брадзоту и анаэробной энтеротоксемии поголовье мелкого рогатого скота. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016; 11: 33–40.
133. Капустин А.В., Скляров О.Д., Лайшевцев А.И. Эффективность применения вакцины «КЛОСТБОВАК-8» против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами *Clostridium* spp. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016; 9: 6–11.
134. Капустин А.В., Якимова Э.А., Савинов В.А., Петкович Д.Д., Лайшевцев А.И. Микробиом репродуктивной системы яловых коров. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2019; 80: 222–228.
135. Каталымов А.С., Власова Н.Н., Капустина О.В., Казакова А.С. Конструирование рекомбинантного продуцента группоспецифического антигена вируса блютанга. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2009; 4: 52–54.
136. Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А. Совершенствование диаг-

- ностики ВЛКРС инфекции у телят. Ветеринария и кормление. 2013; 1: 16–18.
137. Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Клименко А.И. Совершенствование ПЦР диагностики инфекции, индуцируемой вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Научное обеспечение инновационного развития отечественного животноводства. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. 2011; 3–11.
138. Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Калабеков И.М., Малоголовкин А.С. Оптимизация ПЦР для выявления ДНК провируса лейкоза КРС с использованием сконструированных праймеров, комплементарных участку провирусного гена POL. Ветеринария и кормление. 2011; 1: 16–18.
139. Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Калабеков И.М., Малоголовкин А.С. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение RU 2445370 С1 от 20.03.2012.
140. Козырева Н.Г., Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Малоголовкин А.С., Клименко А.И., Разумовская В.В. Филогенетический анализ участка провирусного гена POL изолятов вируса лейкоза крупного рогатого скота, обнаруженных у животных из различных регионов Российской Федерации. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2011; 6: 48–51.
141. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Мониторинг эпизоотической ситуации и применение молекулярно-генетической диагностики в оздоровительных мероприятиях при лейкозе крупного рогатого скота. Достижения науки и техники АПК. 2014; 1: 47–51.
142. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Алиментарная передача вируса лейкоза крупного рогатого скота. Инфекционные болезни. 2017; 15(С1): 128–129.
143. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Определение генетического статуса изолятов ВЛКРС, распространенных на территории Московской области ЦФО РФ. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2017; 394–395.
144. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Использование молекулярной диагностики лейкоза крупного рогатого скота у молодняка для выявления перинатального инфицирования. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2017; 395–396.
145. Козырева Н.Г., Иванова Л.А., Степанова Т.В., Гулюкин М.И. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение RU 2694617 С1 от 16.07.2019.
146. Концевая Н.Н., Соболева Г.Л., Непоклонова И.В., Алипер Т.И. Инактивированные комбинированные вакцины для профилактики инфекционных abortов коров. Ветеринария. 2013; 11: 10–16.
147. Концевая Н.Н., Соболева Г.Л., Непоклонова И.В., Алипер Т.И. Вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для создания колострального иммунитета у молодняка крупного рогатого скота. Ветеринария. 2016; 5: 8–13.
148. Котельникова А.А., Баннов В.А., Малышев Д.В., Черных О.Ю., Дробин Ю.Д., Донник И.М., Уша Б.В., Лысенко А.А., Клименко А.И., Криво-

- нос Р.А., Юлдашбаев Ю.А., Гулюкин А.М., Шевкопляс В.Н., Кривоногова А.С., Кощаев А.Г., Дельцов А.А., Дайбова Л.А. Тест-система для выявления РНК вируса болезни шмалленберг у сельскохозяйственных животных. Патент на изобретение RU 2694719 С1 от 16.07.2019.
149. Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Выявление вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота при патологии органов воспроизведения. Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. 2015; 1(8): 443–445.
150. Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Южаков А.Г. Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи, выявленного у телят при вспышках респираторных болезней. Ветеринария. 2018; 4: 25–31.
151. Котова М.А., Дудников Л.А. Экспресс-метод определения иммуногенного полипептида VP1 146S компонента вируса ящура. Материалы конференции «Проблемы инфекционной патологии с.-х. животных. Докладов конференции» в г. Владимиро 1997; 49–50.
152. Кощаев А.Г., Инюкина Т.А., Гугушвили Н.Н., Дорожкин В.И., Гулюкин М.И., Степанова Т.В., Шабейкин А.А., Алипер Т.И., Забережный А.Д., Аноятбеков М., Исакандаров М.И., Исакандарова С.С., Успенский А.В., Исаев Ю.Г., Найманов А.Х., Стаффорд В.В. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса сельскохозяйственных животных. Москва–Краснодар, 2019.
153. Лайшевцев А.И. Результаты подбора нового производственного штамма бактерии *Mannheimia haemolytica* «КЛ-ВИЭВ» для изготовления средств специфической профилактики манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 7(67): 288–297.
154. Лайшевцев А.И. Клинико-эпизоотологическое обоснование вакцинопрофилактики и разработка вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2018.
155. Лайшевцев А.И. Манхеймиоз рогатого скота («синее вымя»). Ветеринария и кормление. 2019; 6: 32–34.
156. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Гулюкин А.М. Сравнительный анализ антибиотикочувствительности коллекционных штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных в период до 1990 г., с полевыми изолятами, выделенными в течение 2014–2016 гг. от крупного и мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2016; 63: 132–138.
157. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Пименов Н.В. Обзор современных средств специфической профилактики пастереллеза и манхеймиоза сельскохозяйственных животных. Ветеринария и кормление. 2017; 3: 64–66.
158. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Якимова Э.А., Забережный А.Д., Исакандаров М.И., Шабейкин А.А., Полякова И.В. Диагностика манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота. Научно-обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск. 2019; 128–150.
159. Лайшевцев А.И., Капустин А.В., Якимова Э.А., Лучко М.А., Пименов Н.В. Антибиотикорезистентность эпизоотических изолятов *Mannheimia haemolytica*, выделенных на территории Российской Федерации. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 10(70): 327–330.
160. Лайшевцев А.И., Пименов Н.В., Шайдулина А.Н., Рыбакова Д.И. Роль

- бактерий вида *Trueperella pyogenes* в развитии инфекционных болезней в промышленном животноводстве. Биотика. 2018; 1(20): 49–53.
161. Лайшевцев А.И., Якимова Э.А., Капустин А.В. Новый вакцинный штамм *Mannheimia haemolytica* для производства препаратов против манхеймиоза. Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. 6: 117–121.
162. Лосич М.А., Непоклонова И.В., Верховский О.А., Грибенча С.В., Баландина М.В., Мухин А.Н., Раев С.А., Алипер Т.И. Разработка и использование ИФА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) вируса бешенства. Ветеринария. 2012; 7: 30–35.
163. Львов Д.К., Алексеев К.П., Алимбарова Л.М., Алипер Т.И., Альховский С.В., Андронова В.Л., Баландина М.В., Баринский И.Ф., Батуев Ю.М., Беляев А.Л., Блинова Л.С., Бобкова М.Р., Ботиков А.Г., Бурцева Е.И., Бутенко А.М., Верховская А.Е., Верховский О.А., Власова Н.Н., Галегов Г.А., Гараев М.М. и др. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Руководство по вирусологии. М., 2013.
164. Львов Д.К., Алимбарова Л.М., Альховский С.В., Андронова В.Л., Баринский И.Ф., Беляев А.Л., Бобкова М.Р., Бурцева Е.И., Бутенко А.М., Галегов Г.А., Гараев М.М., Гребенникова Т.В., Грибенча С.В., Григорьев В.Б., Дерябин П.Г., Жирнов О.П., Забережный А.Д., Злобин В.И., Каверин Н.В., Клименко С.М. и др. Медицинская вирусология. Руководство. М., 2008.
165. Маврин Н.А., Непоклонов А.А., Богданова В.С., Верховский О.А. Имуноферментный метод ранней диагностики гиподерматоза. Ветеринария. 2007; 11: 9–11.
166. Маврин Н.А., Непоклонов А.А., Богданова В.С., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В. Антигены из личинок *Hypoderma lineatum* для иммуноферментного анализа. Ветеринария. 2007; 9: 11–14.
167. Макаров В.В., Махамат Н.Я., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Сибирская язва: современное представление и мировое распространение. М., 2019.
168. Макаров В.В., Ямтитина М.Н., Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Инфекционный цикл сибирской язвы. Ветеринария. 2018; 6: 3–9.
169. Макаров В.В., Ямтитина М.Н., Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Гиперспорадичность инцидентов сибирской язвы. Ветеринария. 2019; 1: 22–27.
170. Максимов В.И., Верховский О.А., Москвина А.С. Физиолого-биохимический статус крови телят в процессе онто- и иммуногенеза. Материалы XXII съезда физиологического общества имени И.П. Павлова. 2013; 318.
171. Максимов В.И., Верховский О.А., Москвина А.С. Физиолого-биохимический статус крови телят в раннем постнатальном онтогенезе в процессе вакцинации. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2013; 214: 241–246.
172. Максимов В.И., Верховский О.А., Москвина А.С. Влияние вакцинации на морфофизиологические и физиолого-биохимические показатели крови крупного рогатого скота. Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. 2013; 2(27): 99–104.
173. Максимов В.И., Верховский О.А., Москвина А.С. Изменение картины крови крупного рогатого скота при вакцинации. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2014; 8: 40–48.
174. Малахов Ю.А., Соболева Г.Л., Лебедев О.А., Викторова Е.В. Инфицированность лептоспирями сельскохоз-

- зяйственных животных в Российской Федерации за 1997–1999 гг. Всероссийская научно-практическая конференция. 2000; 21–22.
175. Малышев Д.В., Котельникова А.А., Черных О.Ю., Баннов В.А., Дробин Ю.Д., Донник И.М., Шахов А.Г., Лысенко А.А., Гугушвили Н.Н., Кривонос Р.А., Гулюкин А.М., Шевкопляс В.Н., Исаева А.Г., Тюрин В.Г., Кощаев А.Г., Щукина И.В., Дайбова Л.А., Жолобова И.С. Способ выявления ДНК вируса ринотрахеита (*Bovine herpes virus 1*, BOHV-1) у крупного рогатого скота. Патент на изобретение RU 2700449 С1 от 17.09.2019.
176. Маноян М.Г., Овчинников Р. Современные направления в разработке средств терапии и профилактики микозов животных. Лекарственные препараты для животных. Разработка, производство, эффективность и качество. 2011; 83–84.
177. Маноян М.Г., Овчинников Р., Панин А. Проблема бессимптомного миконосительства у домашних животных, ее социальная значимость и пути решения. Современная микология в России. Материалы 2-го съезда микологов России. 2008; 353–354.
178. Маноян М.Г., Овчинников Р., Панин А.Н. Роль животных-миконосителей в распространении дерматофитозов человека и животных. Лекарственные препараты для животных. Разработка, производство, эффективность и качество. 2011; 85–87.
179. Маноян М.Г., Овчинников Р.С., Панин А.Н. Бессимптомное миконосительство и его значение в распространении дерматофитозов животных и человека. *VetPharma*. 2012; 3: 40–44.
180. Маноян М.Г., Панин А., Овчинников Р. Современные средства специфической профилактики и терапии дерматофитозов животных. Современная микология в России. Материалы 2-го съезда микологов России. 2008; 354–355.
181. Маноян М.Г., Соколов В.В., Буканова Т.О., Гуршева А.С., Панин А.Н. Резистентность возбудителей грибковых заболеваний к противогрибковым препаратам. Успехи медицинской микологии. 2018; 18: 40–43.
182. Маноян М.Г., Соколов В.В., Гуршева А.С., Габузян Н.А., Панин А.Н. Оценка рисков возникновения резистентности к антимикотическим средствам. Успехи медицинской микологии. 2019; 20: 431–436.
183. Моисеева Н.В., Капустин А.В. Антибиотикорезистентность возбудителя гистофилёза КРС — *Histophilus somni*, изолированного на территории РФ. Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения. Материалы национальной научно-практической конференции. 2019; 49–51.
184. Москвина А.С., Максимов В.И., Верховский О.А. Физиолого-bioхимический статус крови крупного рогатого скота в процессе поствакцинального иммуногенеза. Адаптация и становление физиологических функций у животных. Сборник научных тезисов Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня основания кафедры физиологии животных ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. 2010; 166–170.
185. Москвина А.С., Максимов В.И., Верховский О.А. Влияние вакцинации глубокостельных коров на показатели крови их потомства в раннем постнатальном онтогенезе. Современная физиология: от клеточно-молекулярной до интегративной — основа здоровья и долголетия. 2011; 187–188.
186. Москвина А.С., Максимов В.И., Верховский О.А., Алипер Т.И. Влияние

- вакцины «КОМБОВАК» на физиолого-биохимические показатели крови коров. Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011; 29–31.
187. Москвина А.С., Максимов В.И., Верховский О.А. Морфофизиологические показатели крови глубокостельных коров при вакцинации. Вестник Орловского государственного аграрного университета. 2011; 6(33): 65–67.
188. Москвина А.С., Максимов В.И., Верховский О.А. Влияние вакцины «КОМБОВАК» на картину крови глубокостельных коров. Физиология и здоровье человека. Научные труды III съезда физиологов СНГ. 2011; 315–316.
189. Москвина А.С., Максимов В.И., Верховский О.А. Влияние вакцинации на физиолого-биохимический статус крови у крупного рогатого скота. Проблемы биологии продуктивных животных. 2011; 3: 37–41.
190. Муковнин А.А., Найманов А.Х., Гулюкин А.М. Туберкулез крупного рогатого скота в России. Ветеринария. 2020; 7: 19–23.
191. Мясоедов Ю.М., Ездакова И.Ю., Найманов А.Х. Некоторые аспекты иммунопатогенеза туберкулеза. Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2020; 1(45): 12–21.
192. Найманов А.Х. Эволюция оздоровительных мероприятий при туберкулезе крупного рогатого скота. Современные проблемы диагностики и профилактики хронических зооантропонозных инфекций. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти профессора И.А. Косилова. 2009; 126–133.
193. Найманов А.Х., Вангели Е.П., Толстенко Н.Г., Калмыкова М.С. ПЦР на современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота. Ветеринария. 2016; 2: 20–23.
194. Найманов А.Х., Верховский О.А., Савицкая О.А. Диагностическое значение внутрикожной туберкулиновой пробы и у-ИФН ИФА при туберкулезе крупного рогатого скота. Ветеринарная патология. 2004; 1–2(9): 118–121.
195. Найманов А.Х., Верховский О.А., Савицкая О.А., Овдиенко Н.П., Федоров Ю.Н. Определение -интерферона для диагностики туберкулеза. Ветеринария. 2004; 6: 19–21.
196. Найманов А.Х., Верховский О.А., Савицкая О.А., Овдиенко Н.П., Федоров Ю.Н. Определение -интерферона для диагностики туберкулоза. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2007; 1: 38–40.
197. Найманов А.Х., Гулюкин М.И. Микобактериальные инфекции крупного рогатого скота (туберкулез, паратуберкулез). М.: ЗооВетКнига, 2014; 238.
198. Найманов А.Х., Гулюкин М.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М. Организация оздоровительных мер борьбы с туберкулезом животных в России. Ветеринария. 2019; 4: 3–7.
199. Найманов А.Х., Калмыков В.М. ПЦР при диагностике паратуберкулеза крупного рогатого скота. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2012. 3: 30–32.
200. Найманов А.Х., Калмыков В.М. Туберкулез животных. С.-Пб. Лань: 2018; 504.
201. Найманов А.Х., Калмыков В.М., Вангели Е.П., Калмыкова М.С. Вакцинопрофилактика туберкулеза. Ветеринария. 2018; 10: 3–8.
202. Найманов А.Х., Калмыков В.М., Вангели Е.П., Калмыкова М.С. Химиотерапия и химиопрофилактика туберкулеза. Ветеринария. 2019; 9: 3–7.

203. Найманов А.Х., Калмыков В.М., Калмыкова М.С., Муковнин А.А. Выявление больного туберкулёмом крупного рогатого скота в состоянии анергии к туберкулину. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2019; 1: 17–21.
204. Найманов А.Х., Калмыкова М.С., Вангели Е.П., Толстенко Н.Г. ПЦР при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Современные проблемы ветеринарии, зоотехнии и биотехнологии. 2015; 90: 90–93.
205. Найманов А.Х., Муковнин А.А., Мясоедов Ю.М. Способ выявления анергичного, больного туберкулёмом крупного рогатого скота. Патент РФ на изобретение 2657837 С1 от 15.06.2018.
206. Найманов А.Х., Муковнин А.А., Целуева Н.И. Контроль благополучия крупного рогатого скота по туберкулезу в современных условиях. Ветеринария. 2018; 7: 3–7.
207. Найманов А.Х., Солодова И.В., Толстенко Н.Г., Суворов В.С., Якушева О.В. Эпизоотический процесс туберкулеза крупного рогатого скота в зависимости от вирулентности *M. bovis*. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2013; 77: 103–110.
208. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г. Проблемы туберкулеза и особенности ветеринарных мероприятий при туберкулезе крупного рогатого скота. Ветеринарная жизнь. 2011; 5: 1.
209. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П. Обзор эпизоотической ситуации и современные проблемы оздоровительных мероприятий при туберкулезе КРС в РФ. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2013; 77: 110–118.
210. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Букова Н.К., Калмыкова М.С. Паратуберкулез крупного рогатого скота. Ветеринария. 2014; 1: 3–9.
211. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Гулюкин М.И., Букова Н.К. Особенности патологоанатомической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Ветеринария. 2015; 11: 13–17.
212. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М. Диагностическое значение кратности и времени учета результатов внутрикожной туберкулиновой пробы. Ветеринария. 2018; 2: 3–8.
213. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыкова М.С. Проблемы диагностики паратуберкулёза крупного рогатого скота. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2015; 78: 300–305.
214. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Коломыцев С.А., Ткач Н.М. Анализ изменений эпизоотической ситуации и государственных оздоровительных мероприятий при туберкулезе КРС в РФ. Ветеринария и кормление. 2013; 4: 51–54.
215. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Устинова Г.И., Гулюкин М.И. Проблемы диагностики микобактериальных инфекций крупного рогатого скота. Ветеринария. 2014; 6: 3–8.
216. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Устинова Г.И., Кучерук О.Д., Гулюкин М.И. Основные проблемы и пути совершенствования диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление. 2014; 2: 6–9.
217. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Суворов В.С., Якушева О.В. Новые пути распространения и сенсибилизации КРС нетуберкулезными микобактериями. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2010; 76: 71–79.
218. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Вангели Е.П., Кучерук О.Д., Калмыков

- В.М., Толстенко Н.Г. Симультанная туберкулиновая проба для отбора реагирующих животных и установления диагноза на туберкулез. Ветеринария. 2020; 4: 3–6.
219. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Кучерук О.Д. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симультанной пробы для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Ветеринария. 2015; 6: 20–25.
220. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Кучерук О.Д., Гулюкин М.И. Совершенствование симультанной туберкулиновой пробы для дифференциации неспецифических реакций у КРС. Ветеринария и кормление. 2016; 1: 11–13.
221. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Кучерук О.Д., Калмыков В.М. Сравнительное изучение аллергенов для дифференциальной диагностики туберкулеза. Ветеринария и кормление. 2019; 2: 5–7.
222. Нефедченко А.В., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Войтова К.В., Кунгурцева О.В. Частота проявления респираторно-синцитиальной инфекции в зависимости от уровня серопозитивности животных к вирусу диареи крупного рогатого скота. Ветеринарная патология. 2012; 1(39): 49–52.
223. Нефедченко А.В., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Судоргина Т.Е. Практическое значение полимеразной цепной реакции для обнаружения и генотипирования *Pasteurella multocida*. Вестник КрасГАУ. 2019; 7(148): 110–115.
224. Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Комплексный подход к определению этиологической структуры респираторных болезней крупного рогатого скота в молочных хозяйствах. Вестник КрасГАУ. 2017; 1(124): 65–71.
225. Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Частота выявления герпесвируса 4-го типа у крупного рогатого скота при вспышках инфекционных болезней на молочных комплексах. Ветеринария. 2020; 5: 19–23.
226. Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Вопросы вирусологии. 2020; 65(2): 95–102.
227. Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Южаков А.Г., Забережный А.Д. Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени. Вопросы вирусологии. 2019; 64(4): 178–184.
228. Никонова А.А., Глотова Т.И., Семенова О.В., Глотов А.Г. Сравнительное изучение двух методов серологической диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2015; 5(246): 79–86.
229. Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Гайнуллина А.Г., Панин А.Н., Ершов П.П. Грибы рода *Malassezia* в заболеваниях животных клинические формы, диагностика, терапия. VetPharma. 2013; 3(14): 36–52.
230. Овчинников Р., Маноян М.Г., Ершов П., Гайнуллина А. Возрастающая значимость грибов — оппортунистов в этиологии микозов животных. Современная микология в России. Материалы 2-го съезда микологов России. 2008; 356–357.
231. Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Панин А.Н. Эмерджентные грибковые инфекции животных. Успехи медицинской микологии. 2014; 13: 374–376.
232. Орлянкин Б.Г. Классификация и номенклатура ДНК-содержащих вирусов позвоночных. Обзор. Сельскохозяйственная биология. 1995; 4: 3.

233. Орлянкин Б.Г. Классификация и номенклатура РНК-содержащих вирусов позвоночных. Сельскохозяйственная биология. 1996; 2: 3.
234. Орлянкин Б.Г. Противовирусные вакцины третьего поколения. Вестник РАСХН. 1998; 5: 74–76.
235. Орлянкин Б.Г. Структура и биология прионов. Сельскохозяйственная биология. 1998; 2: 46–58.
236. Орлянкин Б.Г. Противовирусный иммунитет. Ветеринария Кубани. 2008; 2: 4–7.
237. Орлянкин Б.Г. Врожденный противовирусный иммунитет. Ветеринария. 2016; 3: 3–10.
238. Орлянкин Б.Г. Адаптивный противовирусный иммунитет. Ветеринария. 2016; 7: 3–11.
239. Орлянкин Б.Г., Гулюкин М.И., Зимарева Н.В., Кунаков К.Ю. Таксономия ретровирусов и характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота. Труды ВИЭВ «Ретровирусные и прионные инфекции животных». 1999; 72: 16–21.
240. Орлянкин Б.Г., Гулюкин М.И., Зимарева Н.В., Кунаков К.Ю. Классификация ретровирусов и характеристика вируса лейкоза крупного рогатого скота. Ветеринария. 2000; 5: 12–19.
241. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Противовирусные вакцины будущего. Материалы Все-российской научно-производственной конференции «Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применение в ветеринарной практике». Ставрополь; 2000; 56–57.
242. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Классификация и номенклатура вирусов позвоночных. Ветеринария. 2001; 10: 15.
243. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Основы противовирусного иммунитета. М.: Библионика, 2011; 232.
244. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Основы противовирусного иммунитета. М.: ЗооВетКнига, 2015; 356.
245. Пименов Н.В., Колесникова Ю.Н., Капустин А.В. Поливалентная вакцина против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота и способ ее применения. Патент на изобретение RU 2699035 C2 от 03.09.2019.
246. Пименов Н.В., Тинаева Е.А., Лайшевцев А.И., Колесникова Ю.Н. Методические рекомендации по профилактике и ликвидации сальмонеллезов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц. М., 2016.
247. Потанин В.Г., Алейников А.Ф., Гулюкин М.И., Храмцов В.В., Амиреков М.А. Анализ эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота с использованием системы мониторинга. Достижения науки и техники АПК. 2012; 11: 64–66.
248. Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д. Разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики микобактерий. Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. 2004; 4: 300.
249. Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. ПЦР в реальном времени для диагностики туберкулеза. Ветеринария. 2006; 9: 54–56.
250. Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Краснова М.А., Скотникова О.И., Алипер Т.Н., Непоклонов Е.А. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для дифференциальной диагностики микобактерий. Вестник Российского университета дружбы народов. Медицина. 2004; 4: 300–308.

251. Пчельников А.В., Алексеенкова С.В., Гулюкин М.И., Степанова Т.В., Юров К.П. Применение методов молекулярной диагностики для выявления и идентификации лимфотропного гаммагерпесвируса крупного рогатого скота — кофактора энзоотического лейкоза. Молекулярная диагностика. Сборник трудов. 2014; 497–498.
252. Савинов В.А., Овчинников Р.С., Капустин А.В., Гайнуллина А.А. Экспресс-диагностика дерматофитозов животных. Аграрная наука. 2019; 10: 20–24.
253. Семенова О.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Генетическое разнообразие и биологические свойства вируса ВД-БС КРС. Saarbrücken. 2013.
254. Семенова О.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Особенность циркуляции BVDV и его этиологическая роль в репродуктивных проблемах крупного рогатого скота в молочно-товарных хозяйствах закрытого типа. Российский ветеринарный журнал. 2017; 7: 9–12.
255. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Инактивированная вакцина против вирусных пневмогастроэнтеритов крупного рогатого скота и телят и способ профилактики вирусных пневмогастроэнтеритов. Патент на изобретение RUS 2261111 от 08.04.2004.
256. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней крупного рогатого скота. Патент на изобретение RUS 2395298 от 31.03.2009.
257. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И., Верховская А.Е., Корицкая М.А., Демкина М.М., Пирожков М.К. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота. Патент на изобретение RUS 2403061 от 29.06.2009.
258. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И., Верховская А.Е., Корицкая М.А., Демкина М.М., Пирожков М.К. Вакцина инактивированная комбинированная против вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и эшерихиоза крупного рогатого скота. Патент на изобретение RUS 2403063 от 28.08.2009.
259. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И., Соболева Г.Л., Концевая Н.Н., Корицкая М.А. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота. Патент на изобретение RUS 2395297 от 31.03.2009.
260. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И., Соболева Г.Л., Концевая Н.Н., Корицкая М.А. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота. Патент на изобретение RUS 2395299 от 31.03.2009.
261. Сидорчук А.А., Забережный А.Д., Алексеева С.В. Молекулярная эпизоотология: возможности и перспективы. Сборник научных трудов «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященный 90-летию Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина. МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. М., 2009; 223–229.
262. Симонова Е.Г., Картавая С.А., Раичич С.Р., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А. Сибирская язва в Российской Федерации: совершенствование эпизоотолого-эпидемиологического надзора

- на современном этапе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018; 17: 2(99): 57–62.
263. Симонова Е.Г., Шабейкин А.А., Раичич С.Р., Локтионова М.Н., Сабурова С.А., Патяшина М.А., Ладный В.И., Гулюкин А.М. Применение геоинформационных технологий для оценки эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по сибирской язве. Анализ риска здоровью. 2019; 3: 74–82.
264. Ситьков В.И., Сурмило А.П., Лемешко В.Н., Малахов Ю.А., Соболева Г.Л., Панин А.Н. Способ получения поливалентной вакцины против лептоспироза животных. Патент на изобретение RU 2096042 C1 от 20.11.1997.
265. Скляров О.Д., Зинова А., Зинова А., Климанов А., Юдин В., Козлов В., Роньшина Н. Чувствительность и специфичность набора для диагностики бруцеллеза КРС иммуноферментным методом на основе моноклональных антител в непрямом варианте. Лекарственные препараты для животных: разработка, производство, эффективность и качество. 2011; 40: 42.
266. Скляров О.Д., Капустин А.В., Лайшевцев А.И. Изучение безопасности применения ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота для животных различных возрастных и физиологических групп. Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2017; 65: 124–130.
267. Скляров О.Д., Капустин А.В., Лайшевцев А.И., Гулюкин А.М. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота. Российский ветеринарный журнал. 2017; 1: 20–23.
268. Скляров О.Д., Климанов А.И., Калядин Д.В., Шунаева Н.А., Букова Н.К. Совершенствование теста для дифференциальной диагностики бруцеллеза животных. Ветеринария. 2019; 1: 28–31.
269. Скляров О.Д., Климанов А.И., Шумилов К.В., Зинова А.А., Букова Н.К., Логинов И.А. Пути решения проблем, обусловливающих актуальность бруцеллеза в РФ. Ветеринария. 2011; 1: 34–38.
270. Скляров О.Д., Моторыгин А.В. Этиологическая структура эшерихиоза телят в Рязанской области. Ветеринария Кубани. 2011; 6: 5–7.
271. Скляров О.Д., Шемельков Е.В., Лайшевцев А.И., Гулюкин А.М., Капустин А.В. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани. 2016; 4: 15–17.
272. Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Искандаров М.И., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М., Федоров А.И. Разработка противобруцеллезнной вакцины на основе протективного антигена. Иппологии и ветеринария. 2019; 3(33): 148–152.
273. Слепцов Е.С., Винокуров Н.В., Федоров В.И., Бочкарев И.И., Сидоров М.Н., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Искандаров М.И., Забродин В.А., Лайшев К.А. Иммунопрофилактика бруцеллеза животных с использованием вакцин из штаммов *Brucella abortus* 19, 104M, 82 и *Brucella suis* 61. Якутский НИИСХ им. М.Г. Сафонова; ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН. Новосибирск. 2019.
274. Снетков К.А., Власова Н.Н., Новикова М.Б., Цыбанов С.Ж. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации и дифференциации вируса блутанга. Ветеринарная патология. 2003; 2(6): 33–35.
275. Снетков К.А., Недосеков В.В., Власова Н.Н., Кривонос Г.И., Чичикин А.Ю., Коломыцев А.А. Оптимизация

- условий выделения РНК вируса блютанга и ЭГБО. Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. 2001; 59–61.
276. Соболева Г.Л. Распространенность и этиологическая структура лептоспироза животных в России. Ветеринария. 2001; 1: 11.
277. Соболева Г.Л. Распространенность, этиологическая структура и специфическая профилактика лептоспироза животных. Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2001.
278. Соболева Г.Л., Ананьина Ю.В., Непоклонова И.В. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных. Российский ветеринарный журнал. 2017; 8: 14–18.
279. Соболева Г.Л., Малахов Ю.А. Лептоспироз крупного рогатого скота. Ветеринария. 2010; 1: 3–7.
280. Соболева Г.Л., Малахов Ю.А., Сурмило А.П., Ситьков В.И. Вакцинопрофилактика лептоспироза животных. Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применения в ветеринарной практике. Всероссийская научно-практическая конференция. 2000; 29–30.
281. Степанова Т.В., Иванова Л.А., Гулюкин М.И., Козырева Н.Г., Стаффорд В.В. Модель для изучения инфекционного процесса, вызываемого вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Аграрная наука. 2018; 11–12: 21–23.
282. Строганова И.Я., Глотов А.Г., Глотова Т.И. Вирусные болезни крупного рогатого скота. Красноярск. 2011.
283. Строганова И.Я., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Посконная Т.Ф. Вирусные и вирусно-бактериальные респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота. Научно-практические рекомендации. Красноярск. 2011.
284. Сухинин А.А., Прасолова О.В., Гулюкин М.И., Стекольников А.А., Макавчик С.А., Кузьмин В.А., Фогель Л.С., Юров К.П., Идиатулин И.Г. Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота. Санкт-Петербург. 2018.
285. Тарасов И.Е., Костина Л.В., Цибезов В.В., Козлов А.Ю., Непоклонов А.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. Штамм гибридных клеток животных *Mus musculus* — продуцент моноклональных антител к ивермектину и моноклональные антитела к ивермектину. Патент на изобретение RUS 2415930 от 29.09.2009.
286. Тарасов И.Е., Костина Л.В., Цибезов В.В., Козлов А.Ю., Непоклонов А.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. ИФА для определения ивермектина с использованием моноклональных антител. Ветеринария. 2009; 4: 59–61.
287. Тарасов И.Е., Цибезов В.В., Непоклонов А.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. Набор для количественного определения авермектинов методом одностадийного конкурентного иммуноферментного анализа. Патент на изобретение RUS 2416094 от 30.12.2009.
288. Телишевская Л.Я., Букова Н.К., Комаров А.А., Ночевый В.Т. Питание и метаболизм патогенных микроорганизмов. М., 2016.
289. Урываев Л.В., Алховский С.В., Самохвалов Е.И., Беляев А.М., Бурцева Е.И., Воркунова Г.К., Гребенникова Т.В., Гущина Е.А., Забережный А.Д., Иванова В.Т., Иванова М.В., Ионова К.С., Латышев О.Е., Маныкин А.А., Носик Д.Н., Парасюк Н.А., Алипер Т.И., Зверев В.В., Львов Д.К. Вирусы как объекты и инструменты нанобиотехнологий. Вопросы вирусологии. 2012; S1: 52–65.
290. Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С., Парасюк Н.А., Селиванова Т.К., Бунькова Н.И., Гущина Е.А., Гребенникова Т.В., Подчерняева Р.Я.

- О контаминации клеточных культур вирусом диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV). Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012; 153: 1: 88–93.
291. Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А., Мезенцева М.В., Костина Л.В., Гущина Е.А., Подчерняева Р.Я., Гребенникова Т.В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. Вопросы вирусологии. 2012. 57(5): 15–21.
292. Федоров Ю.Н., Верховский О.А. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота: характеристика и роль в патологии. Ветеринария. 2007; 1: 18–23.
293. Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Ахмадеев Р.М., Волобуева Н.В., Мукминов М.Н., Валеева А.Р., Москвичева А.В. Использование комбинации антигенов из *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG и ППД при диагностике легочной формы туберкулеза иммуноблотингом. Современные достижения ветеринарной медицины и биологии — в сельскохозяйственное производство. Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР и Башкирской АССР, доктора ветеринарных наук, профессора Хамита Валеевича Аюпова (1914–1987 гг.). 2014; 135–138.
294. Хитрова А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Верховский О.А. Эффективность применения комбинированных вакцин серии КОМБОВАК. Ветеринария. 2006; 9: 17–20.
295. Хитрова А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И. Эффективность применения комбинированных вакцин серии «Комбовак». Ветеринария. 2007; 7: 17.
296. Хитрова А.Е., Соболева Г.Л., Алипер Т.И. Новые препараты для специфической профилактики смешанных инфекционных болезней телят. Ветеринарная медицина Беларуси. 2005; 1: 23.
297. Хитрова А.Е., Соболева Г.Л., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Непоклонова И.В. Антигенная активность вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К. Ветеринария. 2004; 11: 21–23.
298. Храмцов В.В., Двоеглазов Н.Г., Рудницкий В.Ф., Агаркова Т.А., Магер С.Н., Смирнов П.Н., Ткаченко М.Н., Алипер Т.И., Верховский О.А., Амироков М.А. Иммуноферментный анализ при диагностике инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота. ИЭВСиДВ. ИВМ НГАУ. окружная лаборатория ХМАО. НПО Нарвак. АНО НИИ ДПБ. Управление ветеринарии Новосибирской области. Новосибирск. 2008.
299. Цирельсон Л.Е., Желудков М.М., Кулаков Ю.К., Хадарцев О.С., Скляров О.Д. Эпидемические проявления бруцеллеза в различных эпизоотических очагах. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2012; 4(65): 18–22.
300. Цирельсон Л.Е., Желудков М.М., Кулаков Ю.К., Хадарцев О.С., Скляров О.Д. К эпидемиологической и иммунологической оценке очагов бруцеллеза в России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012; 5(66): 24–29.
301. Цирельсон Л.Е., Желудков М.М., Скляров О.Д., Боровой В.Н. Состояние специфической иммунопрофилактики бруцеллеза в Российской Федерации. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2011; 1(56): 59–63.
302. Чернов А.Н., Макаев Х.Н., Ефимова М.А., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Арсланова А.Ф., Насыров Ш.М., Хаертынов К.С., Муртазина Г.Х., Ахмадеев Р.М., Сагдеева Р.Д., Мухамеджанова А.Г. Лабораторная диагностика и профилактика бешенства. Научно-

- обоснованная система противоэпизоотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней домашних животных. Новосибирск. 2019; 12–67.
303. Чернов А.Н., Черных О.Ю., Амерханов Х.А., Забашта С.Н., Васильевич Ф.И., Гулюкин А.М., Кривонос Р.А., Бобров В.А., Кошаев А.Г., Шевченко А.А., Джавадов Э.Д., Клименко А.И. Лабораторная диагностика и профилактика бешенства животных. Краснодар. 2020.
304. Шабейкин А.А., Гулюкин М.И. Современные особенности эпизоотологии сибирской язвы на территории РФ. Ветеринария и кормление. 2013; 3: 15–18.
305. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Зайкова О.Н., Лахтиков С.В., Храмов А.П. Обзор эпизоотической ситуации сибирской язвы в Российской Федерации. Влияние географических факторов на формирование современного ареала болезни. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2015; 78: 422–432.
306. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Южаков А.Г., Зайкова О.Н. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской Федерации. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2015; 4: 5–7.
307. Шаров А.Н., Ерошенко Л.А., Суханов И.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В. ПЦР при диагностике туберкулеза. Ветеринария. 2000; 10: 19.
308. Шаров А.Н., Ерошенко Л.А., Суханов И.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Грабовецкий В.В. Эффективность методов приживленной диагностики туберкулеза. Ветеринария. 2000; 2: 14.
309. Шевченко А.А., Черных О.Ю., Кошаев А.Г., Шевченко Л.В., Кривонос Р.А., Литвинова А.Р., Торопыно А.В., Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Донник И.М., Самуиленко А.Я., Гринь С.А., Мотузко Н.С., Мотузко С.Н., Красочко П.А., Василевич Ф.И., Шевкопляс В.Н., Капустин А.В., Лайшевцев А.И., Гулюкин М.И. и др. Диагностика, профилактика и лечение факторных бактериальных инфекционных болезней животных. Краснодар-М., 2019.
310. Шемелькова Г.О., Алипер Т.И. Сравнительная оценка эффективности разных типов адьювантов в составе вакцины против респираторных болезней телят / Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2013; 77: 204–208.
311. Шемелькова Г.О., Верховская А.Е., Иванов Е.В., Соболева Г.Л., Непоклонова И.В., Алипер Т.И., Шемельков Е.В. Специфическая профилактика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота с использованием комбинированной вакцины. Ветеринария Кубани. 2013; 3: 3–6.
312. Шемелькова Г.О., Южаков А.Г., Соболева Г.Л., Корицкая М.А., Шемельков Е.В., Иванов Е.В., Алипер Т.И. Выделение и биологические свойства аденовируса крупного рогатого скота I типа. Ветеринария. 2013; 4: 8–11.
313. Шуралев Э.А., Ндайишимий Э.В., Мукминов М.Н., Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А. Факторы риска и индикация *Mycobacterium bovis* на территориальном уровне. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2013; 215: 367–371.
314. Юдин В.И., Козлов В.Е., Безгин В.М., Гулюкин М.И., Иванова Л.А. Способ диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Патент на изобретение RU 2377962 С1 от 10.01.2010.

315. Южаков А.Г. Молекулярно-генетический анализ вакциновых и вирулентных штаммов пестивирусов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Национальный исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Российской академии медицинских наук. М., 2009.
316. Южаков А.Г., Богданова О.Ю., Гребенникова Т.В., Хаметова К.М., Мусиенко М.И., Верховский О.А., Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гулюкин М.И. Результаты экспериментального заражения ягнят вирусом болезни Шмалленберг и разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления вирусной РНК. Ветеринария. 2015; 10: 21–25.
317. Южаков А.Г., Гребенникова Т.В., Хаметова К.М., Мусиенко М.И., Верховский О.А., Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гулюкин М.И. Оценка протективных свойств экспериментальной инактивированной вакцины против болезни Шмалленберг. Ветеринария. 2016; 12: 11–16.
318. Южаков А.Г., Устинова Г.И., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Кунгурцева О.В., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Филогенетический анализ нецитопатогенных изолятов вируса диареи крупного рогатого скота. Ветеринария. 2009; 6: 29–32.
319. Юрлов К.П., Гулюкин М.И. Контроль и пути оздоровления скота племенных хозяйств и племенных предприятий от инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. Российская сельскохозяйственная наука. 2018; 1: 59–63.
320. Юсупов О.Ю., Хайров С.Г., Кабардиев С.Ш., Скляров О.Д., Климанов А.И., Ощепков В.Г., Дегтяренко Л.В., Девришов Д.А. Эффективность РНГА при бруцеллезе крупного рогатого скота, овец и коз. Ветеринария. 2015; 11: 22–25.
321. Denisov A.A., Karpova O.M., Kirobovtseva Y.S., Borovick R.V., Salmakov K.M., Sklyarov O.D., Klimanov A.I., Shumilov K.V., Brynskykh M.N. Development and characterization of a modified komarovs bullet for ballistic delivery of live brucella abortus strains 82 and 19 to cattle and bison. Vaccine. 2010; 28(5): F23-F30.
322. Grebennikova T., Kalnov S., Krivonos A., Aliper T., Nepoklonov E. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in blood and tissues from animals. Problems of Quantitation of Nucleic Acids by Amplification Techniques Augustusburg conference of advanced science. Germani. 1996.
323. Grebennikova T., Grabovetsky V., Kalnov S., Nepoklonov E. Differential diagnostics of *Mycobacteria* by PCR in blood and tissues from animals. First International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference. USA. 1997.
324. Grebennikova T., Biketov S.F., Kalnov S.L., Aliper N.I., Nepoklonov E.A. Gene expression of *M. tuberculosis* in cultured macrophages and human clinical samples. 10th European Congress of clinical microbiology and infection diseases. Stockholm. Sweden. 2000; 69.
325. Grebennikova T., Zaberezhny A.D., Soboleva G.L., Malakhov Y.A., Nepoklonova I.V., Aliper N.I., Nepoklonov E.A. Detection of *Leptospira interrogans* in human and animal samples using polymerase chain reaction. 10<sup>th</sup> European Congress of clinical microbiology and infection diseases. Stockholm. Sweden. 2000; 69.
326. Grigoriev V.B., Pokidyshev A.N., Balandina M.V., Gibadulin R.A., Klimenko S.M., Kalnov S.L., Verkhovsky O.A., Tsibezov V.V. Fibrillization of recombinant bovine prion protein (rec-prp) *in vitro*. Doklady Biochemistry and Biophysics. 2008; 420(1): 112–114.
327. Gulyukin A.M., Smolyaninov Y.I., Shabeykin A.A. The economic damage

- caused by rabies of agricultural animals in Russia. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 8(56): 34–38.
328. Ilina E.N., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Solopova O.N., Sveshnikov P.G., Balabashin D.S., Larina M.V., Aliev T.K., Grebennikova T.V., Losich M.A., Zaykova O.N. Generation and characterization of a neutralizing monoclonal antibody against rabies virus. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018; 44(6): 695–704.
329. Kapustin A.V. The study of immunogenic activity of anaerobic infection's experimental vaccine caused by *Clostridium sordellii* of cattle. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 12(60): 241–246.
330. Kapustin A.V. Development of a vaccine against blackleg of cattle. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 5(53): 97–102.
331. Kapustin A.V., Laishevcev A.I. Pasteurellosis of cattle caused by Mannheimia haemolytica. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 4(52): 3–12.
332. Kolesnikova Y.N., Pimenov N.V., Kapustin A.V. The etiology of anaerobic infections of cattle and comparative characteristics of the isolated strains of *Clostridium*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 8(56): 39–48.
333. Kozlova A.D., Gorbacheva N.S., Klimenkova O.V., Laishevcev A.I., Kapustin A.V., Yatsentyuk S.P. The use of molecular genetic techniques for the typing of *Clostridium perfringens*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017; 3(63): 188–194.
334. Kuzmin V., Gulyukin M., Metlin A., Prosvirnin G., Tsyanov A., Orekhov D., Makavchik S., Khakhaev I., Evglevskiy D. Spread dynamics of leucosis in cattle in livestock farms of the Russian Federation for 2000–2018. International Scientific and Practical Conference “AgroSMART — Smart Solutions for Agriculture”. KnE Life Sciences. 2019; 666–673.
335. Laishevcev A.I. Features of biochemical identification and differentiation of Mannheimia haemolytica. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 6(54): 70–77.
336. Laishevcev A.I., Kapustin A.V., Verkhovsky O.A. Structural composition of the bacterial and fungal microflora in the eyes of cattle with an infectious keratoconjunctivitis. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016; 9(57): 97–104.
337. Lomakina N.F., Gulyukin M.I. Genotyping of cattle leucosis viruses circulating in farms of Moscow, Kaluga and Rostov regions. Molecular Diagnosis. 2010; 2: 140.
338. Malakhov Yu.A., Soboleva G., Panin A.N. Epizootic situation on leptospirosis in Russia. Ветеринарно-медицинские науки. 2000; 11: 62.
339. Manoyan M., Sokolov V., Gursheva A., Gabuzyan N., Panin A.N. Sensitivity of isolated dermatophyte strains to antifungal drugs in the Russian Federation. Journal of Fungi. 2019; 5(4): 95.
340. Salmakov K.M., Fomin A.M., Plotnikova E.M., Safina G.M., Galimova G.M., Salmakova A.V., Ivanov A.V., Panin A.N., Sklyarov O.D., Shumilov K.V., Klimanov A.I. Comparative study of the immunobiological properties of live brucellosis vaccines. Vaccine. 2010; 28(5): F35-F40.
341. Savinov V.A., Ovchinnikov R.S., Kapustin A.V., Laishevcev A.I., Gulyukin A.M. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. 2019; 22071.

342. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Stepanova T.V., Kozyreva N.G., Ivanova L.A. Risk assessment for interspecies transmission of enzootic bovine leukemia. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. 2019; 42036.
343. Shemelkova G.O., Yuzhakov A.G., Zaberezhny A.D., Shemelkov E.V., Aliper T.I. Development of a test system for detecting bovine adenovirus DNA based on polymerase chain reaction. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. 2019; 42027.
344. Shumilov K.V., Sklyarov O., Klimanov A. Designing vaccines against cattle brucellosis. Vaccine. 2010; 28(5): F31-F34.
345. Sklyarov O., Shumilov K., Klimanov A., Denisov A. Targeted prevention of brucellosis in cattle, sheep, and goats in the Russian Federation. Vaccine. 2010; 28(5): F54-F58.
346. Wolfram J.H., Kokanov S.K., Verkhovsky O.A. Diagnostic and vaccine chapter. Vaccine. 2010; 28(5): F49-F53.