

На правах рукописи

Власов Михаил Евгеньевич

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ОТ КАБАНОВ И ДОМАШНИХ СВИНЕЙ**

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

пос. Вольгинский – 2021

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ).

Научный руководитель: **Балышев Владимир Михайлович**
доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты: **Матвеева Ирина Николаевна**
доктор биологических наук, профессор, заведующая
отделом молекулярной биологии и вирусологии
ФГБНУ «Всероссийский научно - исследовательский
и технологический институт биологической
промышленности»

Иголкин Алексей Сергеевич
кандидат ветеринарных наук,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», заведующий референтной лабораторией
по африканской чуме свиней

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Сибирский федеральный научный центр
агробиотехнологий РАН»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в «___» часов на
заседании диссертационного совета 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец. Тел:
(4922) 529962

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ»
(г. Владимир). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного
руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан ___ _____ 2021г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова
Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная вирусная болезнь свиней всех пород и возрастов, характеризующаяся лихорадкой, цианозом кожных покровов, геморрагическими, дистрофическими, некротическими поражениями внутренних органов и высокой смертностью (Бакулов И.А., 1983., Sanchez-Votija A.C., 1963). После заноса в 2007 г. АЧС в Грузию болезнь быстро распространилась по странам Евразийского континента, включая Россию, где она приняла эндемичный характер. До 2011 г. заболевание преимущественно регистрировали в Южном и Северо - Кавказском федеральных округах, затем болезнь была занесена в центральные, западные, северо – западные и восточные регионы России. В 2017 г. АЧС установлена в Омской, Иркутской, Тюменской, Челябинской областях, в Красноярском крае и Ямало – Ненецком автономном округе. В 2020 г. в 23 субъектах РФ зарегистрированы 280 вспышек АЧС – 162 среди домашних свиней и 118 среди кабанов. С 2012 г. АЧС регистрировалась в Украине, Белоруссии, Латвии, Литве, Эстонии, Польше, Болгарии, Германии и в ряде других европейских странах. В 2018 г. АЧС диагностировали в Китае, крупнейшем производителе продукции свиноводства в мире. Затем болезнь быстро распространилась в соседние страны: Монголию, Вьетнам, Камбоджу, Филиппины, Индонезию и др.

Наряду с отсутствием средств специфической профилактики одним из факторов распространения АЧС в России и других странах является высокая устойчивость возбудителя к физико-химическим воздействиям, вследствие чего вирус в течение длительного времени может сохранять инфекционность на объектах ветеринарно-санитарного надзора, в секретах и экскретах инфицированных животных. Вовлечение в эпизоотический процесс кабанов может приводить к снижению патогенности вируса и возникновению у них хронических и бессимптомных форм болезни, как в Италии на острове Сардиния (Макаров В.В., 2011., Laddomoda A. et. al., 1994), что может существенно затруднить проведение противоэпизоотических мероприятий, связанных, в первую очередь, с диагностикой болезни. С 2007 г., когда вирус АЧС был занесен в Республику Чечня, по 2015 г. в ГКМ ФИЦВиМ депонировано 32 штамма вируса АЧС. В первичных очагах погибали все домашние свиньи и кабаны с характерными для острой и подострой форм клиническими признаками болезни и патологоанатомическими изменениями (Балышев В.М. и др. 2010).

Новые вспышки АЧС в ранее благополучных регионах России, а также данные о снижении патогенности вируса, выделенного на территории РФ и в пограничных странах в 2014-2015 гг. (Жуков И.Ю. и др. 2015, Zani L. et. al. 2018), свидетельствуют об актуальности исследований по изучению биологических свойств изолятов вируса АЧС, выделенных от домашних свиней и кабанов и депонированию их в ГКМ ФИЦВиМ с целью использования при проведении фундаментальных и прикладных исследований.

Степень разработанности темы исследования. После заноса АЧС в 1957 г. в Европу, вначале в Португалию, а затем и другие страны, зарубежные и отечественные ученые проводили широкие исследования по изучению биологических свойств изолятов вируса, выделенных в очагах болезни от павших и больных свиней (Коваленко Я.Р. и др., 1972, Sanchez-Botija A.C., 1963). Были изучены формы течения болезни, патогенность вируса для домашних свиней и кабанов, его антигенные свойства, некоторые молекулярно-генетические характеристики, разработаны методы культивирования вируса и диагностики болезни. Первые вспышки АЧС на Пиренейском полуострове были вызваны вирусом, который согласно разработанной во ВНИИВВиМ классификации относился к I серотипу. При этом они, как правило, сопровождались высокой летальностью животных. С 1960 г. в неблагополучных по АЧС странах стал циркулировать вирус IV серотипа, который обладал меньшей патогенностью для свиней (Бурлаков В.А., 1979).

Новая эпизоотия АЧС в Европе, связанная с заносом в 2007 г. вируса в Грузию, приняла в настоящее время угрожающие масштабы. В 2007-2020 гг. болезнь регистрировали в 34 европейских и азиатских странах. Полевые изоляты вируса АЧС, выделенные на территории РФ в 2007-2015 гг. от домашних свиней и кабанов, относились к VIII серотипу и II генотипу и вызывали, как правило, гибель всех животных (Балышев В.М. и др., 2010). Однако в последние годы появились сообщения, что в странах ЕС начали выявлять серопозитивных кабанов, что предполагает наличие в природе животных с хроническим течением АЧС (Nurmoja I. et. al., 2017, Zani L. et. al., 2018). Сотрудниками ВНИИЗЖ также показано снижение патогенности вируса АЧС, выделенного в 2014-2015 гг. в Центральном федеральном округе (Жуков И. Ю., 2018, Mur L. et. al., 2016).

Это указывает на актуальность продолжения исследований по изучению биологических свойств новых изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации.

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлось изучение биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса АЧС, выделенных от домашних свиней и кабанов в 2016-2019 гг. в различных регионах РФ и депонирование их в ГКМ ФИЦВиМ.

Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить биологические свойства (патогенность, серотиповую принадлежность, культуральные свойства) и молекулярно-генетические характеристики изолятов вируса АЧС, выделенных в 2016-2019 гг. в различных регионах РФ от домашних свиней и кабанов.

2. Изучить характер течения АЧС у домашних свиней в зависимости от способа заражения животных.

3. Разработать методические положения по паспортизации и депонированию вируса АЧС в ГКМ ФИЦВиМ.

4. Паспортизировать и депонировать в ГКМ ФИЦВиМ выделенные в РФ в 2016-2019 гг. от домашних свиней и кабанов изоляты вируса АЧС.

5. Изучить длительность сохранения инфекционного вируса АЧС в объектах внешней среды, секретах и экскретах инфицированных свиней.

6. Изучить длительность сохранения инфекционного вируса АЧС в осенних жигалках и падальных мухах.

Научная новизна. Изучены биологические свойства 11 изолятов вируса АЧС, выделенных от домашних свиней и кабанов в 2016-2019 гг. во Владимирской, Рязанской, Псковской, Московской, Саратовской, Иркутской, Омской областях, Еврейской АО, Республике Татарстан, Краснодарском и Приморском крае, которые паспортизированы и депонированы в ГКМ ФИЦВиМ.

Исследуемые изоляты вируса АЧС, выделенные от домашних свиней и кабанов, обладают сравнимыми биологическими свойствами: вызывают гибель свиней с признаками сверхострой, острой и подострой форм болезни, накапливаются в сопоставимых титрах в первичных культурах клеток костного мозга свиней (КМС) и лейкоцитов свиней (ЛС), и перевиваемой культуре клеток А₄С₂/9к, являются гемадсорбирующими (ГАд) и относятся к VIII серотипу.

Все 11 изолятов вируса АЧС, на основании филогенетического анализа последовательностей гена В646L, отнесены ко II генотипу. Шесть из семи изученных изолятов на основании последовательностей межгенного региона I73R/I329L (TRS +/-) отнесены к варианту (TRS +) и 1 изолят к варианту (TRS -).

Установлены особенности течения АЧС у домашних свиней в зависимости от способа заражения изучаемыми изолятами.

Получены новые сведения о сроках выделения исследованных изолятов вируса из экскретов и секретов инфицированных свиней, а также длительности сохранения в них инфекционного вируса при различных температурах.

Получены новые экспериментальные данные о вероятных механических переносчиках вируса АЧС - осенних жигалках и падальных мухах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Паспортизированные и депонированные в ГКМ ФИЦВиМ штаммы вируса АЧС, выделенные от домашних свиней и кабанов в различных регионах РФ, могут быть использованы как в прикладных, так и фундаментальных исследованиях при изучении эволюционной изменчивости вновь выделенных изолятов, отличающихся от депонированных по основным биологическим свойствам (патогенности, течению болезни, типовой принадлежности, культуральным свойствам). Сведения о длительности сохранения инфекционного вируса АЧС в организме – осенних жигалках и падальных мухах, которые являются механическими переносчиками вируса и теоретически могут заражать животных в естественных условиях, указывают на необходимость проведения обязательной дезинсекции в системе противоэпизоотических мероприятий при АЧС. Установлены сроки сохранения инфекционного вируса АЧС в

контаминированной почве, водопроводной воде, моче и навозе свиней при различных температурах. «Методические положения по паспортизации и депонированию в коллекцию ГКМ ФИЦВиМ вируса АЧС» применяются при проведении коллекционной работы с новыми изолятами вируса, выделенными от домашних свиней и кабанов.

Методология и методы исследования. В работе использовали методы культивирования первичных и перевиваемых культур клеток, вирусологические, серологические, иммунохимические, молекулярно – генетические методы и статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

Выделенные от домашних свиней и кабанов в различных регионах РФ в 2016-2019 гг. изоляты вируса АЧС вызывают гибель свиней с признаками острой и подострой форм болезни независимо от способа заражения. Изоляты Татарстан-Сосновка/2016 и Иркутск-2017 наряду с острой вызывают сверхострую форму АЧС.

Изученные изоляты вируса АЧС являются ГАд, размножаются в первичных (КМС, ЛС) и перевиваемой (А₄С₂/9к) культурах клетках в титрах 6,0-7,0 и 5,25-5,75 lg ГАЕ₅₀/см³ соответственно. По результатам РЗГАд они относятся к VIII серотипу, а по данным нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа последовательности гена В646L - ко II генотипу.

Выделенные в 2016-2019 гг. в различных регионах РФ от домашних свиней и кабанов изоляты вируса АЧС депонированы в ГКМ ФИЦВиМ и используются при проведении НИР.

В осенних жигалках и падальных мухах инфекционный вирус АЧС сохраняется не менее 5 суток. Они являются механическими переносчиками вируса и могут рассматриваться в качестве вероятных источников заболевания восприимчивых животных.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы исследований выполнялись при оказании консультативной и научно - методической помощи д-ра биол. наук, проф. Юркова С.Г. и д-ра биол. наук, проф., профессора Середы А.Д., а также кандидатов биологических наук Кольцовой Г.С., Титова И.А. и Лыска В.М., за что автор выражает им благодарность.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ФГБНУ ФИЦВиМ, при защите научно-квалификационной работы на Государственной итоговой аттестации по окончании аспирантуры, на Международной научно-практической конференции «Новое слово в науке и практике» ИГСХА им. акад. Д.К. Беляева (г. Иваново, 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 11 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки для докторских и кандидатских диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, приложения: иллюстрирована 20 таблицами и 19 рисунками. Список использованной литературы включает 238 источников, из них 134 иностранных.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы

Вирусы. В работе использовали изоляты вируса АЧС, выделенные в ФГБНУ ФИЦВиМ из патматериала от кабанов из Рязанской (Рязань-Сапожково/2016), Московской (Коломна-Песково/2016), Псковской (Псков-Яшково/2016), Владимирской (Владимир-Вязники/2017) областей, Краснодарского края (Кубань-2017) и от домашних свиней - из Республики Татарстан (Татарстан-Сосновка/2016), Иркутской (Иркутск-2017), Омской (Омск-2017), Саратовской (Саратов-2017) областей, Еврейской автономной области (ЕАО 8951/19) и Приморского края (Приморский 8954/19).

Животные. Клинически здоровых свиней живой массой 25 – 35 кг получали из сектора подготовки подопытных животных ФИЦВиМ.

Культуры клеток. Перевиваемая культура клеток А₄С₂/9к получена из Коллекции клеточных культур ФИЦВиМ. Первичные культуры клеток ЛС и КМС получали согласно ГОСТ 28573-90 «Свины. Методы лабораторной диагностики африканской чумы».- М., 1980 г.

Оборудование и расходные материалы. В работе использовали холодильники низкотемпературные и СО₂-инкубаторы (Sanio); микроскоп инвертированный СК-2 (Olympus); микроскоп инвертированный люминесцентный (Nikon); шкаф ламинарный с вертикальным потоком воздуха II класса защиты (Bellco Glass); термостаты электрические и холодильники бытовые отечественные; микропипетки 1 и 8-канальные (Ленпипет); флаконы пластиковые культуральные и микропланшеты культуральные, а также другое оборудование и расходные материалы.

2.2 Методы исследований

Патогенность. Патогенность изолятов вируса АЧС оценивали при внутримышечном, контактном, интраназальном и пероральном инфицировании свиней различными дозами вируса. Каждую дозу испытывали не менее чем на 2 свиньях. Определяли длительность инкубационного периода, характер клинического проявления болезни, сроки гибели, проявление патологоанатомических изменений, накопление вируса в крови и органах больных и павших свиней. За животными вели

ежедневное клиническое наблюдение с термометрией. Отбор крови у опытных свиней проводили через каждые 2-3 суток после инфицирования.

Заражение свиней. При внутримышечном заражении вирусосодержащий материал в различных дозах вводили свиньям в среднюю треть шеи. Интраназальное заражение осуществляли путем введения материала в верхние дыхательные пути шприцем через силиконовую трубку. При контактном инфицировании к больным АЧС свиньям ставили на 12-14 часов «интактных» животных, которых затем переводили в другие виварные боксы. Для перорального инфицирования использовали контаминированные разными дозами вируса АЧС комбикорм и воду.

Методы индикации и идентификации вируса АЧС. Специфичность заболевания и гибели свиней от АЧС подтверждали выделением вируса в реакции аутогемадсорбции, в культурах ЛС или КМС, РПИФ, которые ставили по ГОСТ 28573-90, а также выделение и постановку ПЦР-РВ проводили набором (Интерлабсервис, Россия) согласно инструкции производителя.

Реакцию задержки гемадсорбции проводили согласно Методическим положениям по типизации вируса африканской чумы свиней (Балышев В.М. и др. 2010) с использованием референс-сывороток и референс-штаммов I, II, III, IV, V, VI, VII, и IX серотипов, которые получали в ГКМ ФИЦВиМ.

Вирусоспецифические антитела в сыворотках крови и в 10% суспензиях органов павших животных выявляли в ТФ ИФА и РНИФ по ГОСТ 28573-90, а также в иммуноблоттинге (ИБ) по методике (Escribano J.M., Tabares E., 1987).

Секвенирование. Нуклеотидное секвенирование использовали для генотиповой идентификации исследуемых изолятов путем анализа последовательности ДНК вируса АЧС. Анализ последовательностей осуществляли с помощью выравнивания с гомологичными известными последовательностями генов вируса АЧС, имеющимися в базе данных GenBank, используя программу ClustalX [10, 15].

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами в программе Microsoft Office Excel 2018.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполняли в ФГБНУ ФИЦВиМ в 2016-2019 гг. в рамках Государственного задания №№ 0615-2016-0001, 0615-2017-0003, 0451-2019-0005 и Государственного контракта № 14.М04.12.0010.

3.1 Патогенность вируса АЧС, выделенного в РФ в 2016-2019 гг.

3.1.1 Характер течения АЧС у инфицированных свиней

Результаты изучения патогенности изолятов вируса АЧС, выделенных от павших и больных кабанов и домашних свиней в 2016-2019 гг. указывают, что все 11 изученных изолятов были патогенными для свиней при внутримышечном, интраназальном, контактном и пероральном способах заражения. Эти изоляты

вызывали гибель свиней в сроки характерные для острой и подострой форм болезни. Изоляты Татарстан-Сосновка/2016 и Иркутск-2017 наряду с острой, вызывали сверхострую форму АЧС.

Все внутримышечно и интраназально зараженные свиньи погибали на 6-11 сутки. При этом длительность клинического проявления болезни и сроки гибели животных в большей степени зависели от биологических свойств изолята, и в меньшей степени – от дозы вируса. Так, изоляты Татарстан-Сосновка/2016 и Иркутск-2017 при внутримышечном заражении в дозах $10^{2,0}$ и $10^{5,0}$ ГАЕ₅₀ вызвали гибель животных на 4 и 6 сутки с признаками сверхострой и острой форм АЧС. Тогда как от изолятов Владимир-Вязники/2017 и Кубань-2017 свиньи погибали на 10 - 11 сутки.

При контактном инфицировании животные, как правило, погибали на 9-14 сутки с признаками острой формы АЧС. Инкубационный период у них составлял 5-8, а длительность клинического проявления болезни - 6-8 суток. Внутримышечно и интраназально зараженные свиньи изолятом Омск-2017 в дозах $10^{2,0}$ и $10^{3,0}$ ГАЕ₅₀ погибали на 8-9 сутки, а при контактном инфицировании гибель животных наступала через 11-12 суток (таблица 1).

Таблица 1 – Патогенность изолята Омск-2017 вируса АЧС для свиней

Способ и доза (ГАЕ ₅₀) заражения	Клинические показатели болезни				
	Инкубац. период (сут.)	Длит. болезни (сут.)	Сроки гибели (сут.)	Максимальная температура тела	Форма болезни
в/м $10^{2,0}$, $10^{3,0}$	3-4	5	8-9	41,3 - 41,5	Острая
и/наз. $10^{2,0}$	4 -5	4	8-9	41,4-41,6	Острая
контактно	5 - 6	6	11-12	41,5-41,8	Острая

Примечание: в/м – внутримышечно; и/наз – интраназально, сут - сутки.

Патогенность вируса АЧС (изоляты Псков-Яшково/2016 и Владимир-Вязники/2017) при пероральном заражении изучали на свиньях, которых инфицировали контаминированными вирусом комбикормом и водой. Доза вируса, которую получали свиньи с комбикормом, составляла $10^{6,0}$ и $10^{7,0}$ ГАЕ₅₀, водой – $10^{4,0}$ и $10^{7,0}$ ГАЕ₅₀. Инфицированные контаминированными комбикормом и водой свиньи погибали на 13-16 и 14-22 сутки ,соответственно, в сроки, характерные для острой и подострой форм АЧС. Инкубационный период у них составлял 7-9 и 8-14 суток и был продолжительнее, чем при других способах заражения. Длительность клинического течения болезни у этих свиней была такой же, как и при других способах заражения – 6-8 суток. Результаты изучения патогенности изолята Владимир-Вязники/2017 для свиней при различных способах заражения приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Патогенность изолята Владимир-Вязники/2017 вируса АЧС для свиней при различных способах заражения

Способ и доза (ГАЕ ₅₀) заражения	Клинические показатели болезни				
	Инкубац. период (сут.)	Длит. болезни (сут.)	Сроки гибели (сут.)	Максимальная температура тела	Форма болезни
в/м 10 ^{2,0} ;10 ^{3,0}	5 - 6	5	10 -11	41,6	Острая
и/наз. 10 ^{2,0} ;10 ^{3,0}	7	5-6	12-13	41,7	Острая
перорально (вода) 10 ^{4,0} ; 10 ^{7,0}	8 - 14	6 - 8	14-22	41,6	Острая, п/острая
перорально (корм) 10 ^{6,0} ;10 ^{7,0}	7 - 9	6-7	13 - 16	41,8	Острая, п/острая

Примечание: в/м – внутримышечно; и/наз – интраназально; п/острая – подострая

У всех внутримышечно, интраназально, контактно и перорально зараженных свиней отсутствовал полный комплекс клинических признаков АЧС. У животных наблюдали угнетение, гипертермию до 41,6 - 41,8 °С, отказ от корма, незначительный цианоз кожи в области ушей и шеи, затрудненное дыхание, у некоторых свиней - парезы и параличи задних конечностей и диарею за 1-2 суток до гибели. У большинства животных отсутствовали выраженный цианоз кожных покровов, поражение слизистой глаз, рвота, артриты и диарея с примесью крови.

При сверхострой форме АЧС у зараженных свиней наблюдали только угнетение и повышение температуры тела в течение 1-2 суток.

3.1.2 Патологоанатомические изменения у павших свиней

У большинства павших с признаками острой и подострой форм АЧС свиней наблюдали схожие патологоанатомические изменения. У животных отмечали незначительный лимфаденит с кровоизлияниями в подчелюстных, средостенных, почечных, паховых и мезентериальных лимфатических узлах. Наиболее выраженные изменения отмечали в желудочных и портальных лимфоузлах, которые были увеличены в 2-3 раза, имели вид кровяного сгустка черного цвета и дряблую консистенцию. Селезенка у большинства животных незначительно увеличена, кровенаполнена, с точечными кровоизлияниями, темно-красного или темно-фиолетового цвета. Увеличение селезенки (в 1,5-2 раза) было у свиней, павших от острой формы АЧС после заражения изолятами Иркутск-2017, Татарстан-Сосновка/2016, ЕАО 8951/2019. Печень у большинства свиней увеличена незначительно, темно-вишневого цвета, кровенаполнена, без видимых кровоизлияний. Сердце и почки у большинства павших животных имели единичные точечные кровоизлияния, либо изменения отсутствовали. Однако у павших от сверхострой формы АЧС животных (изоляты Иркутск-2017 и Татарстан-Сосновка/2016) были множественные кровоизлияния на эпикарде и точечные кровоизлияния под капсулой почек. У свиней, павших после интраназального заражения в грудной полости, отмечали наличие серозно-геморрагического экссудата, гиперплазию средостенных

лимфоузлов, отек и точечные кровоизлияния в легких. У перорально зараженных свиней, павших на 14 - 22 сутки, наблюдали выраженный лимфаденит мезентериальных лимфоузлов с кровоизлияниями в паренхиме, точечные кровоизлияния на слизистой оболочке тонкого кишечника и под капсулой почек, наличие серозно-геморрагического экссудата в брюшной полости. У павших после внутримышечного, интраназального и перорального способов заражения свиней изолятом Псков-Яшково/2016, патизменения были слабо выражены, их отмечали только в желудочных, портальных и мезентериальных (при пероральном заражении) лимфоузлах. На рисунках 1-6 приведены патологоанатомические изменения в органах свиней, павших после заражения изучаемых изолятами вируса АЧС.



Рисунок 1. Геморрагический спленит у павшей свиньи при в/м заражении (изолят Иркутск-2017).



Рисунок 2. Геморрагический лимфаденит портальных л/у у павшей свиньи при и/н заражении (изолят Омск-2017).



Рисунок 3. Геморрагический лимфаденит мезентериальных л/у павшей свиньи при пероральном заражении (изолят Владимир-Вязники 2017).

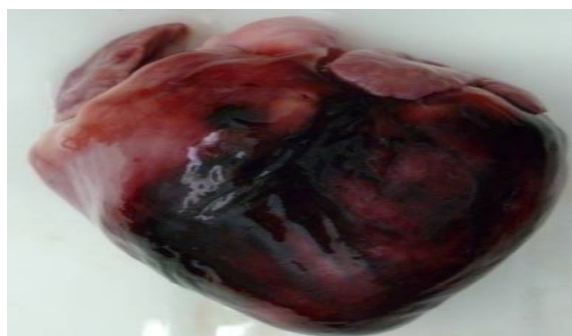


Рисунок 4. Обширные кровоизлияния на эпикарде павшей свиньи при в/м заражении (изолят Иркутск-2017).



Рисунок 5. Отек и застойная гиперемия легких у контактно зараженного подсвинка (изолят Татарстан-Сосновка/2016)



Рисунок 6. Органы павшей свиньи при внутримышечном заражении (изолят Псков –Яшково/2017).

3.1.3 Патогенные свойства изолята Владимир-Вязники/2017 вируса АЧС при последовательных пассажах на свиньях

С целью изучения возможного снижения патогенности вируса АЧС при пассажах на свиньях были проведены четыре последовательных пассажа изолята Владимир-Вязники/2017, выделенного от отстрелянного кабана, контактным способом заражения. При проведении первого контактного пассажа, использовали внутримышечно зараженную этим изолятом свинью. Все опытные свиньи погибали с признаками острой формы болезни на 10-14 сутки. Инкубационный период у свиней в первом контактном пассаже составлял 8-9, втором и третьем 5-6 и четвертом 7-8 суток. У заболевших животных отмечали подъем температуры тела до 41,4-41,8 °С, угнетение, отказ от корма, затрудненное дыхание, у отдельных свиней парезы задних конечностей. Незначительный цианоз кожи ушей, и шеи отмечали только у свиней во втором (1 голова) и третьем (1 голова) пассажах.

Полученные результаты свидетельствуют, что в течение четырех последовательных контактных пассажей не происходит снижение патогенности для свиней изолята Владимир-Вязники/2017 вируса АЧС. Все животные погибли с признаками острой формы болезни, как и при внутримышечном заражении.

3.1.4 Сравнительное изучение патогенности изучаемых изолятов и штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС при различных способах заражения

С целью выявления возможных изменений в патогенных свойствах вируса АЧС, в процессе циркуляции на территории РФ было проведено сравнительное изучение патогенности референс-штамма Ставрополь 01/08, выделенного в 2008 г. в Ставропольском крае, с патогенностью исследуемых изолятов. С этой целью свиней заражали штаммом Ставрополь 01/08 внутримышечно и интраназально в дозе $10^{2,0}$ ГАЕ₅₀, и перорально с кормом в дозе $10^{7,0}$ ГАЕ₅₀. У всех опытных свиней отмечали гипертермию до 41,5-41,9°С, цианоз кожи ушей, шеи, живота и промежности, угнетение, отказ от корма, нарушение координации движений, болезненное дыхание, парезы задних конечностей, у отдельных животных диарею с примесью крови. Инкубационный период и длительность клинического проявления болезни у внутримышечно и интраназально зараженных животных составляли 3-6 и 4-5, а у перорально инфицированных – 6-11 и 4-6 суток.

Патологоанатомические изменения в органах всех павших свиней были характерны для острой формы АЧС и ярко выражены. В грудной и брюшной полостях павших животных наблюдали скопление серозно - геморрагического экссудата. Селезенка увеличена, кровенаполнена, дряблая на разрезе от темно-красного до черноватого цвета. Подчелюстные, средостенные, портальные, желудочные, почечные и мезентериальные лимфоузлы увеличены с множественными точечными кровоизлияниями.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что патогенность изолятов вируса АЧС, выделенных от кабанов и домашних свиней в 2016-2019 гг., была сравнима с патогенностью референс-штамма Ставрополь 01/08. Однако клинические признаки и

патологоанатомические изменения у павших свиней, инфицированных изучаемыми изолятами, были менее выражены, чем у животных, зараженных штаммом Ставрополь 01/08 выделенным в начале эпизоотии АЧС в РФ в 2008 г.

3.1.5 Накопление вируса АЧС в крови и органах павших свиней

Накопление вируса АЧС в крови и органах павших свиней, определяли в первичных (ЛС, КМС) и перевиваемой (А₄С₂/9к) культурах клеток.

В крови и органах павших с признаками острой и подострой формы АЧС свиней, вирус накапливался в одинаковых титрах. Его накопление при титровании в культурах клеток КМС и ЛС составляло: в крови 6,5-7,5, в селезенке 5,5-7,0, в печени 4,0-5,0, в лимфоузлах 3,5-5,0, в легких и почках 2,0-3,0 lg ГАЕ₅₀/см³. При титровании этих образцов в культуре клеток А₄С₂/9к титр вируса был ниже на 1,0-1,5 lg ГАЕ₅₀/см³. Аналогичное накопление вируса АЧС было в крови и органах свиней, павших после заражения референс – штаммом Ставрополь 01/08.

3.1.6 Культуральные свойства изолятов вируса АЧС

Стабильность культуральных свойств испытуемых изолятов изучали в течение 10 последовательных пассажей в культурах клеток ЛС и А₄С₂/9к при множественности заражения 0,1 и 0,01 ГАЕ/кл.

Накопление изучаемых изолятов вируса АЧС в культуре ЛС в 1-м пассаже достигало 5,0-5,5 lg ГАЕ/50см³. В последующих пассажах титр вируса стабилизировался и составлял 6,0-7,0 lg ГАЕ/50см³. Аналогичную закономерность наблюдали и при культивировании этих изолятов в культуре А₄С₂/9к. В 1 пассаже инфекционная активность вируса составляла 4,0-4,5 lg ГАЕ/50см³. Максимальное накопление вируса в этой культуре клеток при последующих пассажах достигало 5,0-5,75 lg ГАЕ₅₀/см³.

Специфическую ГАД в культуре ЛС наблюдали на 2-3 сутки, в культуре клеток А₄С₂/9к - на 3-4 сутки. При этом, наибольшее количество клеток со специфической ГАД было в культуре клеток ЛС (Рис. 7, 8).

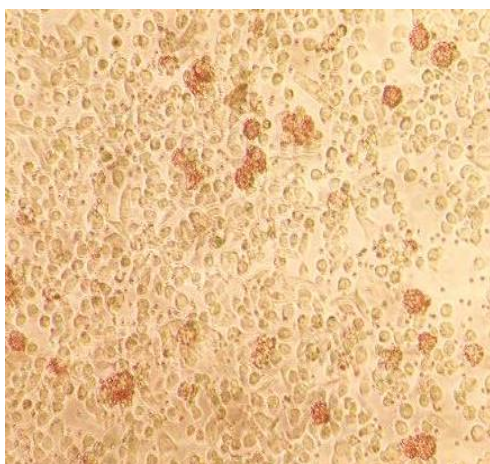


Рисунок 7. ГАД в культуре ЛС (3 сутки) после заражения изолятом Омск-2017 вируса АЧС.

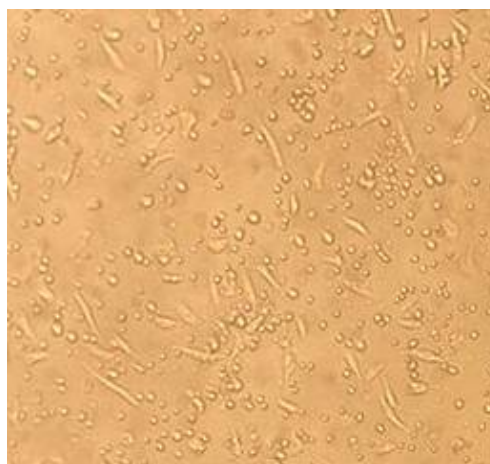


Рисунок 8. Контрольная культура клеток ЛС.

3.1.7 Обнаружение вирус специфических антител в сыворотках крови и органах павших свиней

С этой целью получали надосадочную жидкость из 10 % суспензий селезенки, печени, легких и лимфатических узлов. Выявление антител проводили в РНИФ, ИФА и ИБ. Титр антител в сыворотках крови больных свиней на 6-7 суток составлял: в ИФА – 1:4-1:8, в РНИФ – 1:8-1:16, в ИБ – 1:4-1:8. В органах павших свиней в наиболее высоких титрах антитела выявляли в ИФА – в титрах 1:80-1:160. В РНИФ их чаще выявляли в лимфатических узлах и селезенке в титре 1:10-1:20, методом ИБ антитела чаще обнаруживали в легких в таких же титрах-1:10-1:20.

3.1.8 Определение серотиповой принадлежности испытуемых изолятов вируса АЧС в РЗГАд

Сведения о серотиповой принадлежности микроорганизмов являются основополагающими при паспортизации вирусных и бактериальных штаммов. В связи с этим были проведены исследования по определению серотиповой принадлежности изучаемых изолятов вируса АЧС в РЗГАд. В реакции использовали освеженные в культуре ЛС изучаемые изоляты вируса АЧС, а также референс – сыворотки и референс – штаммы I - IX серотипов.

Установлено, что все изучаемые изоляты вируса АЧС относились к VIII серотипу, как и референс-штаммы Родезия и Ставрополь 01/08.

Контрольные референс - сыворотки I- IX серотипов ингибировали гемадсорбцию только у гомологичных референс - штаммов вируса АЧС.

3.1.9 Определение генотиповой принадлежности

На следующем этапе были проведены исследования по определению генотиповой принадлежности изучаемых изолятов вируса АЧС, что необходимо учитывать при их паспортизации. По результатам нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа на основании последовательности гена В646L все 11 изученных изолятов вируса АЧС были отнесены ко II генотипу.

В связи с широкой циркуляцией в Европе вируса АЧС II генотипа было использовано исследование межгенного участка I73R/I329L, для точной дифференциации изолятов вируса внутри этого генотипа (Gallardo C. et. al., 2014). На основании данного анализа у некоторых, выделенных в Украине, Белоруссии, Литве и Польше изолятов была выявлена дополнительная десятинуклеотидная встройка. С учетом этих данных нами были проведены аналогичные исследования по изучению 7 изолятов вируса, выделенных в 2016 – 2019 гг. в различных регионах Российской Федерации. В результате проведенного анализа последовательностей участка I73R/I329L установлено, что изоляты Саратов-2017, Омск 2017, Владимир-Вязники-2017, Приморский 8954/19, Псков-Яшково/2016 и ЕАО 8951/19 имеют в данном участке генома вируса АЧС встройку размером 10 нуклеотидных пар ТАТАТАGGAA (варианты вируса TRS+). По этому показателю они были сходны с изолятами, циркулирующими на территории других стран Европы. Однако, выделенный в 2017 г. в Сибирском

федеральном округе от павшей домашней свиньи изолят Иркутск-2017, не имел такую вставку и относился к варианту (TRS-) и имел сходство со штаммом Georgia 2007/1, выделенным в 2007 г. в Грузии.

Эти данные указывают, что большинство изолятов вируса АЧС, выделенных на территории России среди кабанов и домашних свиней в 2016-2019 гг., относятся к II генотипу к варианту (TRS+), однако в некоторых регионах циркулируют изоляты, относящиеся к варианту (TRS-) (Рис 8).

	172370	172380	172390	172400	172410	172420	172430	172440	172450	172460
Georgia 2007/1	TAAATAACAAG		TATATAGGAATATATAGG			AAATATATAGAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAATCSA				
Irkutsk-2017										
Saratov-2017			TATATAGGAA							
Omsk-2017			TATATAGGAA							
Vladimir-Vyazniki/2017			TATATAGGAA							
Primorskiy 8954/19			TATATAGGAA							
Pskov-Yaskkovo/2016			TATATAGGAA							
Ev. avt. reg 8951/19			TATATAGGAA							

Рисунок 8. Анализ нуклеотидной последовательности участка генома I73R/I329L изолятов вируса АЧС, выделенных в РФ в 2016-2019 гг.

3.2. Паспортизация изолятов вируса АЧС

На основании изучения биологических свойств изолятов вируса АЧС, выделенных в 2016-2019 гг. от домашних свиней и кабанов в 11 субъектах РФ, проведена их паспортизация. Штаммы депонированы в Государственную коллекцию микроорганизмов и используются в настоящее время в ФГБНУ ФИЦВиМ при выполнении фундаментальных и прикладных исследований. В паспортах на новые штаммы указана основная информация о наименовании штамма и его таксономия, сведения от кого выделен штамм, сведения об авторах штамма, месте и дате его выделения, основных биологических свойствах (инфекционная активность, патогенность, чувствительность культур клеток и др.) и молекулярно-генетических характеристиках, условиях и длительности хранения, периодичности освежения и др. Паспорта на депонированные в ГКМ ФИЦВиМ штаммы вируса АЧС приведены в Приложении к диссертации (приложения 1-8). При выполнении этого раздела исследований разработаны «Методические положения по паспортизации и депонированию вируса АЧС в ГКМ ФИЦВиМ» (приложение 9), а так же СОП 00586-01 «Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней», СОП 00561-01 «Получение органно-тканевого вируссодержащего материала для последующей лиофиоизации или криоконсервации», СОП 00571-01 «Оценка биологической активности патогенных биологических агентов вирусной этиологии при длительном хранении» (приложения 10-12), которые одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБНУ ФИЦВиМ.

3.3. Сроки обнаружения вируса АЧС в крови, секретах и экскретах инфицированных свиней

Наличие вируса АЧС в крови, моче, слюне и фекалиях инфицированных изучаемыми изолятами свиней определяли в культуре клеток ЛС в РГАД и методом ПЦР-

РВ. С этой целью в отобранные образцы секретов (слюна) и экскретов (моча, фекалии) вносили физиологический раствор в соотношении 1:3 и после тщательного перемешивания, замораживания и оттаивания, центрифугировали при 3000 оборотов в течение 15 минут. Полученные надосадки обрабатывали антибиотикам и использовали в исследованиях.

В крови инфицированных свиней вирус АЧС выделяли за 1-2 суток до появления у животных первых клинических признаков болезни (повышения температуры тела). Титр вируса в крови свиней в эти сроки составлял 2,5-3,5 lg ГАЕ₅₀/см³. В слюне заражённых свиней, вирус АЧС выделяли только у клинически больных животных через 1-2 суток после повышения у них температуры тела, когда накопление вируса в их крови достигало 5,0 lg ГАЕ₅₀/см³. В эти же сроки вирус АЧС обнаруживали в моче больных свиней, его максимальное накопление достигало 3,0-3,5 lg ГАЕ₅₀/см³. Методом ПЦР-РВ во всех испытуемых образцах выявляли также и геном вируса АЧС.

В фекалиях больных свиней вирус АЧС не обнаруживали. Однако в образцах с примесью крови вирус и его геном выявляли обоими методами.

3.4. Сохраняемость вируса АЧС в объектах внешней среды

Учитывая, что сохраняемость вируса АЧС во внешней среде зависит от многих факторов, в частности от его инфекционной активности и окружающей температуры, нами были проведены исследования по изучению длительности сохранения инфекционного вируса в почве, воде, навозе и моче при различных температурах. Выделение вируса из навоза и почвы проводили методом батистовых тестов (Руководство. Р. 4.2. 2643-10, М. 2010).

С этой целью в эти образцы массой по 200 г вносили батистовые тесты, контаминированные вирусосодержащей кровью свиньи, штамм Ставрополь 01/08 и изолят Омск-2017 (по 0,2 см³) с инфекционной активностью 7,0 lg ГАЕ₅₀/см³. В водопроводную воду объемом 100 см³ вносили по 1,0 см³ аналогичной вирусосодержащей крови. Мочу отбирали от больных АЧС свиней, активность вируса в которой составляла 3,0-3,25 lg ГАЕ₅₀/см³. Вирус из контаминированных образцов выделяли в культуре ЛС. Наиболее продолжительное время вирус АЧС сохранял инфекционность в водопроводной воде, которая при температурах (18±2) °С, (2±2) °С и минус (20±2) °С составляла 9 месяцев, 2 года 7 месяцев и более 3 лет (срок наблюдения), соответственно. В контаминированном навозе и почве, хранившихся при температурах (18±2) °С и (2±2) °С, вирус АЧС оставался инфекционным в течение 21-30 и 30-45 суток, соответственно. В моче, при этих температурах, вирус АЧС выделяли в культуре ЛС в течение 21 и 60 суток. Методом ПЦР-РВ в этих образцах так же выявляли геном вируса АЧС. Внутримышечно зараженная свинья контаминированной вирусом АЧС мочой (изолят Омск-2017), хранившейся в течение 21 суток при температуре (18±2)⁰С, заболела на 11 сутки и пала от АЧС на 18 сутки.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что в контаминированных вирусом АЧС в почве, водопроводной воде, моче и навозе свиней, хранящихся при температурах (18±2) °С, (2±2) °С и минус (20±2) °С, вирус сохраняет

инфекционность от 21 суток до 3 лет, что необходимо учитывать при проведении дезинфекционных мероприятий.

3.5 Сохраняемость вируса АЧС в осенних жигалках и падальных мухах

В качестве вероятных механических переносчиков вируса АЧС могут быть слепни и мухи. Установлено, что осенняя муха жигалка (*Stomoxys calcitrans*) способна сохранять и передавать свиньям вирус АЧС в течение 48 часов (A.S. Olesen et.al. 2018.). С учетом этого нами были проведены исследования по изучению сохраняемости вируса АЧС в осенних жигалках и падальных мухах. С этой целью мух обоих видов «кормили» в стерильном боксе вирусосодержащей кровью (шт. Ставрополь 01/08) с титром 7,0 lg ГАЕ₅₀/см³, нанесенной на предметные стекла. Через каждые 24 часа в течение 5 суток из 20 опытных мух каждого вида готовили суспензии на среде Игла МЕМ в соотношении 1:4 (объем/объем), их надосадки использовали для заражения культуры клеток ЛС. На 3-4 сутки в культурах ЛС, инфицированных пятью образцами суспензий каждого вида мух, наблюдали характерную для вируса АЧС «плотную» ГАД. Титр вируса в суспензиях мух, полученных на пятые сутки после «кормления», составлял - 1,5-2,0 lg ГАЕ₅₀/см³. Методом ПЦР-РВ во всех испытуемых образцах также выявляли геном вируса АЧС. Для определения патогенности вируса АЧС в осенних жигалках и падальных мухах, их суспензиями, полученными на 5-е сутки после «кормления» вирусосодержащей кровью, инокулировали внутримышечно 2-х свиней в объеме 1,0 см³. Свиньи заболели и пали на 12 и 14 сутки с характерными признаками АЧС.

В осенних жигалках и падальных мухах инфекционный вирус АЧС сохраняется не менее 5 суток (срок наблюдения) и в течение этого времени они теоретически способны заражать восприимчивых животных.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

1. Изучены биологические свойства и молекулярно-генетические характеристики 11 изолятов вируса АЧС, выделенных в 2016-2019 гг. в различных регионах Российской Федерации от павших и больных домашних свиней и кабанов.

2. Изоляты вируса АЧС, выделенные от домашних свиней - Татарстан - Сосновка/2016, Саратов-2017, Иркутск-2017, Омск-2017, Приморский 8954/19, ЕАО 8951/19 и от кабанов - Рязань-Сапожково/2016, Псков-Яшково/ 2016, Коломна-Песково/2016, Владимир-Вязники/2017, Кубань-2017, обладают сходными патогенными свойствами и вызывают гибель свиней с признаками острой и подострой форм болезни. Изоляты Татарстан - Сосновка/2016 и Иркутск-2017 вызывают острую и сверхострую формы АЧС.

3. Все изученные изоляты вируса АЧС являются ГАД, размножаются в первичных (КМС, ЛС) и перевиваемой (А₄С₂/9к) культурах клетках и накапливаются в них до 6,0-7,0 и 5,25-5,75 lg ГАЕ₅₀/см³ соответственно. По результатам РЗГАД они относятся к 8 серотипу, а по данным нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа по гену В646L - ко II генотипу.

4. Выделенные в 2016-2019 гг. во Владимирской, Рязанской, Псковской, Московской, Саратовской, Иркутской, Омской областях, Еврейской АО, Республике Татарстан, Краснодарском и Приморском краях от домашних свиней и кабанов 11 изолятов вируса АЧС паспортизированы и депонированы в ГКМ ФИЦВиМ

5. Все внутримышечно, интраназально, контактно и перорально инфицированные, изучаемыми изолятами свиньи погибали от сверхострой, острой и подострой формы АЧС без проявления полного симптомо-комплекса клинических признаков и патологоанатомических изменений. При этом наиболее продолжительный инкубационный период и сроки наступления гибели свиней после заражения были у перорально инфицированных животных – 9 – 14 и 14 – 22 суток, соответственно.

6. В осенних жигалках и падальных мухах, после «кормления» вирусосодержащей кровью, инфекционный вирус АЧС сохраняется не менее 5 суток, они являются механическими переносчиками вируса и могут рассматриваться в качестве потенциальных источников заражения домашних свиней и кабанов в естественных условиях.

7. В контаминированных вирусом АЧС почве, моче и навозе свиней, хранившихся при температуре (18 ± 2) °С и (2 ± 2) °С вирус сохраняет инфекционность в течение 21-30 и 30-60 суток, соответственно. Наиболее длительное время вирус остается инфекционным при этих температурах в водопроводной воде – от 9 месяцев до 2 лет 7 месяцев.

4.2 Практические предложения

Паспортизированные и депонированные в ГКМ ФИЦВиМ 11 штаммов вируса АЧС, выделенные в различных регионах Российской Федерации в 2016 – 2019 гг., используются в настоящее время при проведении фундаментальных и прикладных исследований. Разработанные «Методические положения по паспортизации и депонированию в коллекцию ГКМ ФИЦВиМ вируса АЧС» а так же СОП 00586-01 «Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней», СОП 00561-01 «Получение органно-тканевого вирусосодержащего материала для последующей лиофилизации или криоконсервации», СОП 00571-01 «Оценка биологической активности патогенных биологических агентов вирусной этиологии при длительном хранении» применяются при проведении коллекционной работы с новыми изолятами вируса, выделенными от домашних свиней и кабанов. Установлены сроки сохранения инфекционного вируса АЧС в организме членистоногих – осенних жигалках и падальных мухах, которые являются механическими переносчиками вируса, что указывает на необходимость проведения обязательной дезинсекции при осуществлении противоэпизоотических мероприятий при АЧС.

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Изучение биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса АЧС, выделенных на территории Российской Федерации, позволит получить новые данные о патогенности, форме течения болезни, выраженности клинических признаков и патологоанатомических изменений, серотиповой и генотиповой принадлежности, инфекционной активности, характере гемадсорбции.

Целесообразно продолжить изучение сохраняемости вируса АЧС в осенних жигалках и падальных мухах, а также возможности инфицирования домашних свиней и кабанов данными видами мух.

6. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Власов, М.Е. Клинические проявления болезни и патологоанатомические изменения у свиней, инфицированных изолятами вируса африканской чумы свиней, выделенными от кабанов / **М.Е. Власов** // Научный журнал Куб.ГАУ. – 2017. - №134. – С. 1-11.
2. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика вируса африканской чумы свиней, выделенного в 2016-2017 гг. в различных регионах Российской Федерации / В.М. Балышев, **М.Е. Власов**, А.Р. Иматдинов и др. // Российская сельскохозяйственная наука. – 2018. - № 4. – С. 54-58.
3. Сохраняемость вируса африканской чумы свиней в объектах внешней среды / **М.Е. Власов**, И.А. Сливко, А.Д. Серeda // Ветеринария. – 2018. - №10. – С. 17-22.
4. Валидация тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга / О.А. Дубровская, А.Д. Серeda, А.С. Казакова, А.Р. **М.Е. Власов**, В.М. Балышев, Д.В. Колбасов // Сельскохозяйственная биология. – 2018. - Т. 53, №2.- С. 430-437.
5. Сохраняемость вируса африканской чумы свиней в осенних жигалках и падальных мухах / М.Е. Власов, А.Д. Серeda, В.М. Балышев // Ветеринария. – 2019, № 8. – С. 22-25.
6. Особенности течения африканской чумы у свиней, инфицированных изолятами вируса АЧС, выделенными в Российской Федерации/ **М.Е. Власов**, А.К. Сибгатуллова, В.М. Балышев// Ветеринария. – 2019 - № 4. – С.15-19.
7. Роль кабанов в распространении африканской чумы свиней на территории Владимирской области / В.А. Журавлёва, М.В. Сидлик, В.М. Лыска, **М.Е. Власов**, В.М. Балышев // Ветеринария. – 2019. - № 5. – С. 3-8.
8. Анализ генетических маркеров изменчивости изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных на территории Российской Федерации/ А.К. Сибгатуллова, М.В. Нефедьева, Д.А. Кудряшов, **М.Е. Власов**, И.А. Титов// Ветеринария. – 2020.- № 2. – С. 14 – 19.
9. Сибгатуллова, А.К. Генетические маркеры вируса африканской чумы свиней / А. К. Сибгатуллова, **М.Е. Власов**, И.А. Титов// Ветеринария. – 2020. - № 4 – С. 21-26.
10. Characteristics of african swine fever virus isolated from domestic pigs and wild boars in the Russian federation and south Ossetia/ **M. Vlasov**, A. Imatdinov, I. Titov, N. Vasković, V. Lyska, T. Sevskikh, A. Sybgatullova, E. Pivova, S. Morgunov, V. Balyshev // Acta Veterinaria-Beograd. – 2020 – Vol. 70, N 1 –P. 58 – 70..
11. Сибгатуллова А.К. Пространственно-временные характеристики генотипирования по межгенному участку I73R/I329L изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Российской Федерации/ А.К. Сибгатуллова, **М.Е. Власов**, Д.А. Лунина// Ветеринария. – 2021.- № 1.– С. 29-33.
12. Сибгатуллова А.К. Распространение африканской чумы свиней в Тверской области/ А.К. Сибгатуллова, М.Е. Власов, Д.А. Лунина// Ветеринария. – 2021. – № 5. – С.24-30.

Подписано в печать _____ 2021 г.

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 1

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ

«Федеральный центр охраны здоровья животных»